

# **Affinitätskapillarelektrophorese für Bindungsstudien von Proteinen und Arzneistoffen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig



zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von     Mona Mozafari Torshizi  
aus     Teheran / Iran

1. Referent:	Professor Dr. Hermann Wätzig
2. Referent:	Professor Dr. Conrad Kunick
eingereicht am:	13.09.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am:	18.12.2017

Druckjahr 2018

## Veröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Veröffentlichungen

Mozafari, M., Nachbar, M., El Deeb, S., *precise small volume sample handling for capillary electrophoresis*, Electrophoresis 36: 2665-2669 (2015)

Mozafari, M., Balasupramaniam, S., Preu, L., El Deeb, S., Reiter, Ch., Wätzig, H., *using affinity capillary electrophoresis and computational models for binding studies of heparinoids with P-selectin and other proteins*, Electrophoresis 00: 1-12 (2017)

Mozafari, M., El Deeb, S., Krull, F., Weber, G., Reiter, Ch., Wätzig, H., *interaction of albumins and heparinoids investigated by affinity capillary electrophoresis and free flow electrophoresis*, (Paper in preparation)

### Tagungsbeiträge

Mozafari, M., Nachbar, M., Redweik, S., El Deeb, S., Wätzig, H., *affinity capillary electrophoresis as an appropriate technique to investigate interactions of differently phosphorylated ERK1 activation loops with various metal ions*, (Poster) CE-Forum 2014 in Marburg

Mozafari, M., Nachbar, M., Redweik, S., El Deeb, S., Wätzig, H., *interactions of differently phosphorylated ERK1 with various metal ions studied by affinity capillary electrophoresis*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2014 in Frankfurt am Main

Mozafari, M., El Deeb, S., Wätzig, H., *affinity capillary electrophoresis to investigate the interactions of pentosan polysulfate sodium and related substances with proteins*, (Poster) CE-Pharm 2015 in New York

Mozafari, M., Nachbar, M., El Deeb, S., *precise handling of ultra-small sample volumes in conventional capillary electrophoresis instruments*, (Poster) CE-Pharm 2015 in New York

Mozafari, M., El Deeb, S., Wätzig, H., *affinity capillary electrophoresis as an appropriate technique to investigate the interactions of pentosan polysulfate sodium and related substances with various proteins*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2015 in Düsseldorf

Mozafari, M., Nachbar, M., El Deeb, S., *handling small sample volume for capillary electrophoresis investigations*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2015 in Düsseldorf

Mozafari, M., El Deeb, S., Wätzig, H., *investigating the interaction of various heparinoids with proteins using affinity capillary electrophoresis*, (Poster) HPLC Tagung 2015 in Genf

Mozafari, M., Nachbar, M., El Deeb, S., *precise ultra-small volume sample handling for capillary electrophoresis*, (Poster) HPLC Tagung 2015 in Genf

Mozafari, M., Balasupramaniam, S., El Deeb, S., Wätzig, H., *affinity capillary electrophoresis and computational methods for binding studies of P-selectin with heparinoids*, (Poster) CE-Pharm 2016 in San Diego

Mozafari, M., El Deeb, S., Wätzig, H., *investigating the concentration dependent binding of heparinoids to albumins using affinity capillary electrophoresis*, (Poster) CE-Pharm 2016 in San Diego

Mozafari, M., Balasupramaniam, S., El Deeb, S., Wätzig, H., *investigating the interaction of the adhesion protein P-selectin with heparinoids using affinity capillary electrophoresis and computational methods*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2016 in München

Mozafari, M., El Deeb, S., Wätzig, H., *using affinity capillary electrophoresis to investigate the concentration dependent binding of heparinoids to albumins*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2016 in München

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Mentor, Herrn Professor Dr. Hermann Wätzig für die Überlassung dieses interessanten Themas, freundliche Betreuung und die stets nette Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Ich danke ihm dafür, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat, in seinem Arbeitskreis zu promovieren und an zahlreiche nationale und internationale Tagungen und Konferenzen teilzunehmen.

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick möchte ich gerne für die freundliche Übernahme des Koreferates herzlich danken.

Besonders herzlich möchte ich mich außerdem bei Herrn Dr. Lutz Preu bedanken, der mich in meiner Promotionszeit stets freundlich unterstützt hat und meine Arbeit korrekturgelesen hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinem aktuellen und ehemaligen Arbeitskreis: Franziska, Julia, Jorrit, Matthias, Tobias, Imke, Thomas und Markus bedanken.

Außerdem gilt mein Dank der netten „Kaffee-Runde“: Hans-Otto, Petra, Sandra und alle, die dazu gehören. Die netten Kaffeepausen haben immer für eine nette Unterhaltung, Energie und Humor gesorgt.

Desweiteren möchte ich mich bei meinen besten Freunden: Steffi, Claudia, Joschi, Nicole und Mareke bedanken, die immer an mich geglaubt haben und mir Energie und Kraft gegeben haben, weiter zu machen.

Bei der Erstsemesterpraktikumsbetreuung: Marion, Shanthy, Anke und Svenja möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit bedanken.

Meinen guten Freunden aus der Uni: Shanthy, Marion, Claudia, Miri, Kirstin und Waldemar möchte ich für die unendliche Unterstützung während meiner Promotionszeit danken, und dafür, dass sie immer für mich da sind.

Mein besonderer Dank gilt Shanthy für die liebe Zusammenarbeit und die Durchführung der computerchemischen Methoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Darüber hinaus möchte ich mich bei bene pharmaChem für die Bereitstellung der PPS-Substanz und die finanzielle Unterstützung herzlich bedanken.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern: Azar Parhizkar und Hossein Mozafari, die mich auf meinen Weg durch das Studium begleitet haben, an mich geglaubt haben, mich liebevoll unterstützt haben und mir Kraft, Energie und Liebe gegeben haben.

Außerdem möchte ich mich bei meiner ganzen Familie, meinem Freund Christian und bei allen Menschen, die mich begleiten und an mich glauben bedanken.

# **Für meine Eltern**

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

**„Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.“**

Franz Kafka



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung .....	1
2	Einführung .....	3
2.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese / Kapillarzonenelektrophorese (CZE)3	
2.1.1	Theoretische Grundlagen .....	3
2.1.2	Instrumenteller Aufbau.....	6
2.2	Affinitätskapillarelektrophorese (ACE).....	7
2.2.1	Mobility Shift Affinitätskapillarelektrophorese.....	7
2.2.2	Datenauswertung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen .....	7
2.3	Wechselwirkungsuntersuchung verschiedener Liganden mittels ACE..	9
2.3.1	Metallionen .....	9
2.3.2	Heparinoide als Arzneistoffe .....	9
3	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK) .....	12
3.1	Struktur und Eigenschaften von ERK.....	12
3.2	Versuchsaufbau, untersuchtes ERK-Peptid und Metallionen .....	13
3.3	Ergebnisse .....	15
3.4	Zusammenfassung.....	22
4	Ist ACE eine geeignete Methode zur Untersuchung von Heparinoid-Protein Wechselwirkungen? Eine Fallstudie am Beispiel von Affinitätsuntersuchungen zwischen Heparinoiden und Protamin .....	23
4.1	Protamin.....	23
4.2	Eingesetzte Heparinoide .....	24
4.3	Ergebnisse .....	25
4.3.1	Wechselwirkungen von PPS mit Protamin.....	25
4.3.2	Wechselwirkungen von Enoxaparin-Natrium mit Protamin .....	28

4.4	Zusammenfassung.....	31
5	Untersuchung der Wechselwirkungen von Standardproteinen sowie Vitronectin mit Heparinoiden .....	33
5.1	Einführung und Charakterisierung der untersuchten Proteine.....	33
5.1.1	$\beta$ -Lactoglobulin .....	33
5.1.2	Rinderserumalbumin (BSA) .....	34
5.1.3	Humanserumalbumin (HSA) .....	34
5.1.4	Myoglobin .....	35
5.1.5	Ovalbumin .....	35
5.1.6	Vitronectin.....	36
5.2	Eingesetzte Heparinoide .....	36
5.3	Ergebnisse .....	36
5.4	Zusammenfassung.....	38
6	Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden .....	39
6.1	Versuchsaufbau und untersuchte Heparinoide .....	39
6.2	Ergebnisse .....	39
6.2.1	Wechselwirkungen von BSA mit Heparin .....	39
6.2.2	Wechselwirkungen von BSA mit PPS.....	43
6.2.3	Wechselwirkungen von BSA mit Enoxaprin-Natrium .....	45
6.2.4	Wechselwirkungen von HSA mit Heparin .....	47
6.2.5	Wechselwirkungen von HSA mit PPS.....	51
6.2.6	Wechselwirkungen von HSA mit Enoxaprin-Natrium .....	54
6.2.7	Zusätzliche Interaktionsuntersuchungen von anderen Chargen von BSA, HSA und rekombinantem HSA mit Heparinoiden in ausgewählten Konzentrationen.....	56
6.3	Zusammenfassung.....	59

7	Einsatz kleiner Probenvolumina bei kommerziellen kapillarelektrophoretischen Instrumenten.....	61
7.1	Grund des Einsatzes kleiner Probenvolumina.....	61
7.2	Vorgehensweise, Probenvorbereitung und Eignungstest mittels Standardproteinen.....	62
7.3	Ergebnisse .....	63
7.3.1	Kapillarelektrophoretische Untersuchungen der Standardproteine in Ab- und Anwesenheit von Silikonöl.....	63
7.3.2	Affinitätskapillarelektrophoretische Untersuchungen von HSA und Vitronectin in Ab- und Anwesenheit von Silikonöl .....	65
7.4	Zusammenfassung.....	67
8	Untersuchung der Wechselwirkungen des Adhäsionsproteins P-Selektin mit Heparinoiden .....	68
8.1	Struktur und physiologische Funktion von P-Selektin.....	68
8.2	Affinitätskapillarelektrophoretische Untersuchungen unter Volumenreduktion .....	71
8.2.1	Versuchsaufbau und eingesetzte Heparinoide .....	72
8.2.2	Ergebnisse.....	72
8.3	Computergestütztes Docking mit MOE .....	77
8.3.1	Einführung, Versuchsbedingungen und Validierung der verwendeten Methode .....	77
8.3.2	Ergebnisse.....	81
8.4	Zusammenfassung.....	85
9	Untersuchung der Wechselwirkungen von toxischen Urinsubstanzen mit Heparinoiden .....	87
9.1	Einführung: Urothel und Interstitielle Zystitis .....	87
9.2	Untersuchte Substanzen.....	89
9.2.1	N <sup>7</sup> -Methylguanodin .....	89
9.2.2	N <sup>6</sup> -Methyladenosin .....	90

9.3	Versuchsaufbau und Ziele.....	91
9.4	Ergebnisse .....	92
9.4.1	N <sup>7</sup> -Methylguanosin .....	92
9.4.2	N <sup>6</sup> -Methyladenosin .....	96
9.5	Zusammenfassung.....	100
10	Zusammenfassung und Ausblick.....	101
11	Experimenteller Teil.....	102
11.1	Material .....	102
11.1.1	Gerät und Software .....	102
11.1.2	Eingesetzte Kapillare.....	102
11.1.3	Reagenzien und Chemikalien.....	103
11.2	Methoden.....	104
11.2.1	Pufferlösungen .....	104
11.2.2	EOF-Markerlösungen .....	104
11.2.3	Probenlösungen .....	105
11.2.4	Ligandenlösungen .....	105
11.3	Trennbedingungen und Spülprotokolle .....	106
11.3.1	Extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK).....	106
11.3.2	Protamin .....	108
11.3.3	BSA, HSA, Standardproteinen und Vitronectin.....	108
11.3.4	Eignungstest der kleinen Probenvolumina .....	110
11.3.5	P-Selektin .....	112
11.3.6	Toxische Urinsubstanzen .....	114
12	Literaturverzeichnis .....	116
13	Lebenslauf.....	129

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Affinitätskapillarelektrophorese
ASE	Alpha Sphere und Exclusion Sphere
BSA	Rinderserumalbumin
CE	Kapillarelektrophorese
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAD	Diodenarray-Detektor
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor-2
GAG	Glykosaminoglykan
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
HSA	Humanes Serumalbumin
IC	Interstitielle Zystitis
ICS	Internationale Kontinenzgesellschaft
LPA	Linear polyacrylamide
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOE	Molecular Operating Environment
PBS	Painful bladder syndrome
PDB	Protein Datenbank
pI	Isoelektrischer Punkt
PPS	Pentosan Polysulfat Natrium
PSGL-1	P-Selektin-Glykoperoteine-Ligand-1
rHSA	Rekombinantes humanes Serumalbumin
RMSD	Root Mean Square Deviation
SCRs	Short Consensus Repeats
sLe <sup>x</sup>	Sialyl-Lewis <sup>x</sup>
TIMP3	Metalloprotease 3

## Symbolverzeichnis

$\Delta P$	Injektionsdruck [mbar]
$\Delta R$	Differenz der Mobilitätsquotienten
$\text{cnf}((R_i - R_f)/R_f)$	Konfidenzintervall der Differenz der
$E$	Elektrische Feldstärke [ $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ]
$E$	Elektrische Feldstärke [ $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ]
$e_0$	Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}$ ]
$F_E$	Elektrische Kraft [N]
$L$	Länge der Kapillare [m]
$l_{\text{ges}}$	Kapillargesamtlänge [m]
$n_1$	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (1)
$n_2$	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (2)
$R$	Mobilitätsquotient
$r$	Innenradius der Kapillare [m]
$R_f$	Mobilitätsquotient im puren Laufpuffer
$r_i$	Stokesscher Radius eines Ions $i$ [m]
$R_i$	Mobilitätsquotient in Gegenwart einer
$t$	Injektionszeit [s]
$t_{\text{EOF}}$	Migrationszeit vom EOF-Marker [min]
$t_{\text{prot}}$	Migrationszeit des Proteins [min]
$t_{\alpha/2, n_1+n_2-2}$	Student-t-Verteilung
$U$	Elektrische Spannung [V]
$V_i$	Migrationsgeschwindigkeit des Ions $i$ [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$z_i$	Anzahl der Ladung pro Teilchen $i$
$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
$\eta$	Viskosität der Elektrolytlösung [ $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ]
$\sigma_{\text{total}}$	totale Standardabweichung

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Bindungsstudien spielen nicht nur für die Arzneimittelforschung und -entwicklung eine dauerhaft wichtige Rolle, sondern sie werden auch in der Arzneistoffanalytik immer häufiger eingesetzt.

Es stehen zahlreiche Techniken zur Durchführung von Bindungsstudien zur Verfügung. Zu den wichtigsten analytischen Methoden gehören hierbei kapillarelektrophoretische Methoden, die zahlreiche Vorteile mit sich bringen, zu denen geringer technischer Aufwand, schnelle und einfache Probenvorbereitung, kurze Analysezeiten und Einsatz kleiner Probenvolumina zu zählen sind.

Eine wichtige kapillarelektrophoretische Methode, die speziell für Bindungsstudien eingesetzt wird, stellt die Affinitätskapillarelektrophorese (ACE) dar. In dem sogenannten „*Mobility Shift*“ Modus der Affinitätskapillarelektrophorese werden die Änderungen von Analyt-Migrationszeiten nach der Interaktion mit Liganden zur Berechnung der Interaktionsstärke herangezogen.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels ACE Wechselwirkungsstudien von ausgewählten Proteinen mit Heparinoiden durchzuführen.

Heparinoide sind Arzneistoffe, die vor allem wegen ihrer antikoagulativen Wirkung eingesetzt werden. Wie die Bezeichnung Heparinoid ausdrückt, bezeichnet man hiermit alle Arzneistoffe, die eine heparin-ähnliche Struktur und Wirkung aufweisen. Abhängig von der Länge der Polysaccharidkette und der Verknüpfungsstelle der Saccharidmoleküle greifen die Heparinoide an verschiedenen Stellen der Koagulationskaskade ein.

Eine wichtige Substanz dieser Arzneistoffgruppe, bei der noch ein hoher Forschungsbedarf vorhanden ist, stellt Pentosan Polysulfat Natrium (oder abgekürzt PPS) dar. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass PPS nicht nur eine antikoagulative Wirkung besitzt, sondern auch vielseitige andere pharmakologische Wirkungen zeigt.

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit sollten ACE-Bindungsstudien bilden, bei denen das Interaktionspotential von PPS mit bestimmten Proteinen im Interesse des Kooperationspartners bene pharmaChem, im Vergleich zu den anderen Heparinoiden untersucht werden sollte. Darüber hinaus wurden zum Teil die gewonnenen experimentellen Ergebnisse durch computerchemische Modellrechnungen auch theoretisch begründbar gemacht.

Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit sollte die Untersuchung von Wechselwirkungen eines speziellen, synthetisch hergestellten, ERK 1-Peptids mit ausgewählten Metallionen darstellen. Dabei sollte aufbauend auf einer Vorarbeit festgestellt werden, welchen Einfluss die Phosphorylierung des ERK 1-Peptids auf die Wechselwirkungen mit Metallionen hat, da Bindungsstudien von Proteinen mit Metallionen besonderes im Hinblick auf die Entzündungskaskade (Beispiel: Nickel-Allergie) generell vom großen Interesse sind. Die erzielten Ergebnisse, die unter einer Optimierung der verwendeten Methode durchgeführt worden sind, sollten im Anschluss mit den Ergebnissen aus der Vorarbeit verglichen werden.

Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich noch untersucht werden, wie sich der Einsatz von sehr kleinen Probenvolumina bei kommerziellen Elektrophoresegeräten verwirklichen lässt, damit bei den Bindungsstudien, die mit kostenintensiven und wertvollen Analyten durchgeführt werden sollten (Beispiel: biomolekulare Proben), möglichst kleine Probenvolumina eingesetzt werden können.



## 2 Einführung

### 2.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese / Kapillarzonenlektrophorese (CZE)

Die Kapillarelektrophorese (CE) konnte sich seit ihrer Einführung Anfang der 1980er Jahre als eine sehr wichtige Variante der Elektrophorese durchsetzen. Schnelle Trennungen mit hoher Trennleistung sowie Einsatz sehr kleiner Probenvolumina zählen unter anderem zu den Vorteilen dieser Methode. Unter dem Begriff CE werden sowohl elektrochromatographische Methoden, als auch elektrophoretische Methoden zusammengefasst. Die Kapillarzonenlektrophorese gehört zu den elektrophoretischen Methoden, deren Trennprinzip auf der unterschiedlichen Mobilität und damit dem unterschiedlichen Migrationsverhalten der Analyten in einem elektrischen Feld entlang einer Kapillare beruht [1,2].

#### 2.1.1 Theoretische Grundlagen

Wenn über eine Kapillare, die eine Länge  $L$  aufweist, eine Spannung  $U$  angelegt wird, so wird ein elektrisches Feld  $E$  erzeugt, das sich nach der Formel 2-1 berechnen lässt [1,2].

$$E = \frac{U}{L} \quad (2-1)$$

$E$ : Elektrische Feldstärke [ $V \cdot m^{-1}$ ]  
 $L$ : Länge der Kapillare [ $m$ ]  
 $U$ : Elektrische Spannung [ $V$ ]

Dieses elektrische Feld übt auf Ionen oder andere geladene Teilchen eine Kraft aus, die durch die Formel 2-2 zu berechnen ist [1,2].

$$F_E = z_i \cdot e_0 \cdot E \quad (2-2)$$

$F_E$ : Elektrische Kraft [ $N$ ]  
 $E$ : Elektrische Feldstärke [ $V \cdot m^{-1}$ ]  
 $e_0$ : Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot s$ ]  
 $z_i$ : Anzahl der Ladung pro Teilchen  $i$

Bei der Elektrophorese bewegen sich die Ionen in einem viskosen Medium. Mit steigender Geschwindigkeit erfahren die Ionen eine zunehmende Reibungskraft  $F_R$ , so dass sich nach kurzer Zeit eine konstante Migrationsgeschwindigkeit  $V_i$  einstellt. Für annähernd sphärische Teilchen kann die Reibungskraft über die Stokes'sche Gleichung formuliert und die resultierende Geschwindigkeit nach der Formel 2-3 berechnet werden [1,2].

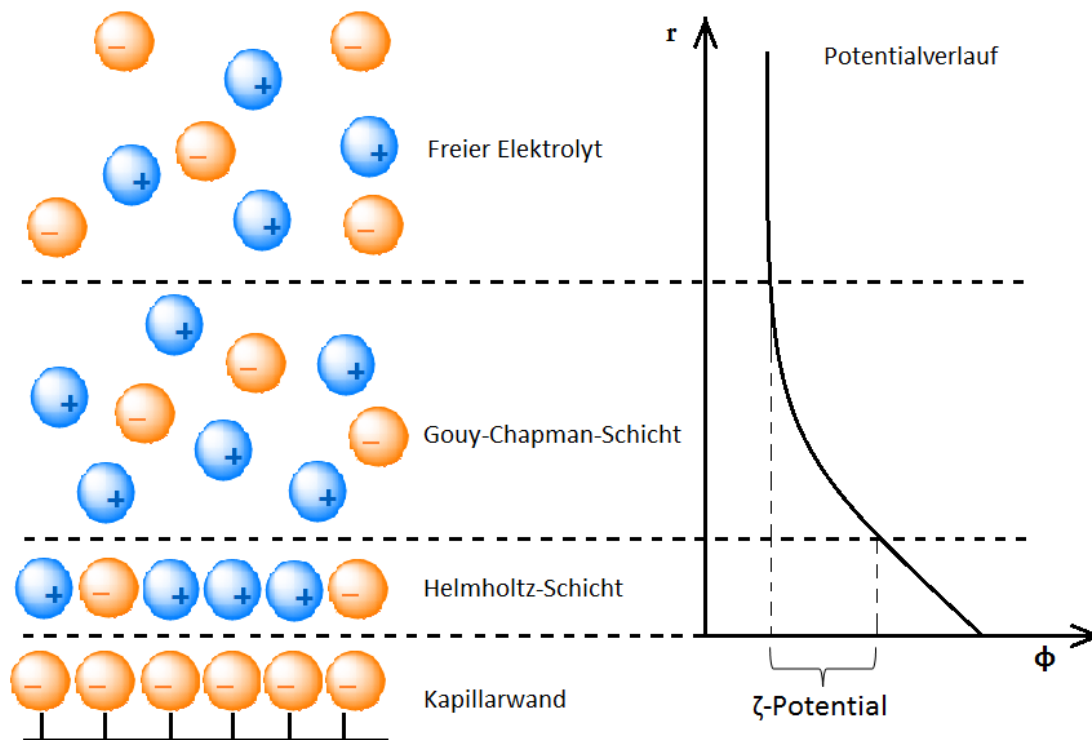
$$V_i = \frac{z \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} = \mu_{abs} \cdot E \quad (2-3)$$

$V_i$ :	<i>Migrationsgeschwindigkeit des Ions <math>i</math> [<math>m \cdot s^{-1}</math>]</i>
$e_0$ :	<i>Elementarladung [<math>1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot s</math>]</i>
$z_i$ :	<i>Anzahl der Ladung pro Teilchen <math>i</math></i>
$r_i$ :	<i>Stokesscher Radius eines Ions <math>i</math> [<math>m</math>]</i>
$\eta$ :	<i>Viskosität der Elektrolytlösung [<math>Pa \cdot s</math>]</i>
$E$ :	<i>Elektrische Feldstärke [<math>V \cdot m^{-1}</math>]</i>

Bei dieser Formel stellt  $\mu_{abs}$  die absolute Mobilität dar, die die Migrationsgeschwindigkeit mit der elektrischen Feldstärke verknüpft [1,2].

Die Kieselgel-Kapillaren (fused silica), die normalerweise in der CE eingesetzt werden besitzen an ihrer Oberfläche Silanolgruppen mit einem pKa-Wert von ungefähr 2. Bei vielen üblichen kapillarelektrophoretischen Methoden, die mit Puffersystemen mit pH-Werten  $> 2$  arbeiten, sind diese Silanolgruppen fast vollständig dissoziiert, sodass eine negative Oberflächenladung erzeugt wird. Die entgegengesetzt geladenen Ionen aus der Elektrolytlösung lagern sich nun an dieser Oberfläche an und bauen eine Schicht aus positiv geladenen Teilchen auf. Daraus ergibt sich die Bildung eines Potentialgefälles von der Kapillarwand über die Grenzschicht bis zum freien Elektrolyten. Das Modell von Stern charakterisiert diese Grenzschichten folgendermaßen: Die adsorbierte Schicht von (positiv geladenen) Gegenionen, die auch Helmholtz-Schicht genannt wird, weist einen linearen Potentialabfall auf und steht im Gleichgewicht mit der diffusen Schicht (Gouy-Chapman-Schicht), deren Potential exponentiell mit dem Abstand abnimmt. Da die Helmholtz-Schicht relativ fest an der Kapillarwand gebunden wird, ist das Potentialgefälle über die Gouy-Chapman-Schicht

entscheidend für das Verhalten des Elektrolyten in einer Kapillare und wird als  $\zeta$ -Potential bezeichnet [1,2] (siehe Abbildung 2-1).

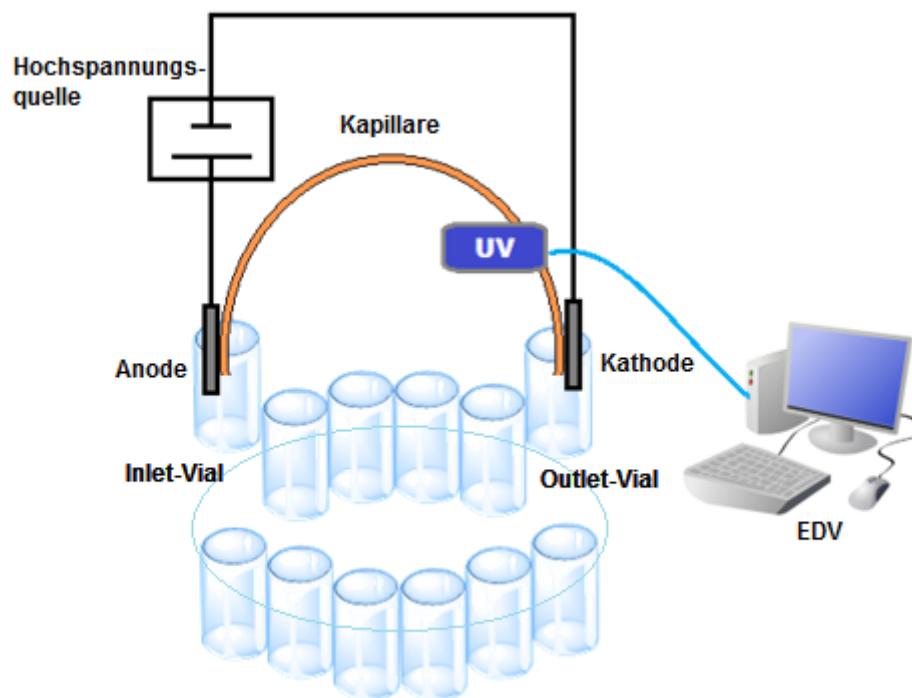


2-1 Schematische Darstellung des Potentialgefälles an einer Quarzglaskapillarwand. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [1,2].

Wird ein elektrisches Feld entlang der Kapillare angelegt, so bewegt sich die Gouy-Chapman-Schicht aufgrund des entsprechenden Überschusses an positiven Partialladungen in der mobilen Phase in Richtung der Kathode. Die Kraft wirkt auf die mobile Phase auf der gesamten Kapillarlänge und erzeugt ein Strömungsprofil, das einer idealen Kolbenströmung entspricht und elektroosmotischer Fluss genannt wird. Die Impulsübertragung von den beschleunigten Ionen auf die mobile Phase erfolgt dabei in Abhängigkeit von der Viskosität des Elektrolyten über die Solvathüllen. Der elektroosmotische Fluss (EOF) bietet somit die Möglichkeit des Stofftransportes in elektrophoretischen Methoden. In der Praxis wird die Geschwindigkeit des EOF dadurch bestimmt, dass neutrale Marker-Substanzen zugegeben werden, die keine Eigenmobilität im elektrischen Feld aufweisen und daher mit dem EOF durch die Kapillare wandern. Die Kontrolle des EOF spielt für viele Trennaufgaben in der CE eine entscheidende Rolle [1,2].

### 2.1.2 Instrumenteller Aufbau

Eine Kapillarelektrophorese-Anlage zeichnet sich gegenüber anderen analytischen Systemen durch eine verhältnismäßig geringe technische Komplexität und ein Minimum an mechanisch bewegten Komponenten aus. Sie besteht üblicherweise aus zwei Elektrolytgefäßen mit Elektroden, die über eine Quarzglaskapillare miteinander verbunden sind, einer regelbaren Hochspannungsquelle (-30 bis +30 kV), einem Detektor und einer Auswerteeinheit mit Datenspeicher. Die Quarzglaskapillaren sind mit einer Polyimidschicht versehen, die zur optischen Detektion am Detektionsfenster entfernt wird. Je nach der verwendeten Methode sind Längen zwischen 10 und 100 cm und Innendurchmesser zwischen 50 und 100  $\mu\text{m}$  im Gebrauch. Die Probenaufgabe erfolgt entweder hydrostatisch durch Anheben/Absenken eines Elektrolytgefäßes, hydrodynamisch durch Druck, oder elektrokinetisch durch Anlegen einer Hochspannung [1,2]. In der Abbildung 2-2 ist eine CE-Anlage schematisch dargestellt.



2-2 Schematische Darstellung des Aufbaus eines CE-Gerätes. Probeneinlassseite (Inlet), Probenauslassseite (Outlet). Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [1,2].

## 2.2 Affinitätskapillarelektrophorese (ACE)

### 2.2.1 Mobility Shift Affinitätskapillarelektrophorese

Die Mobility Shift Affinitätskapillarelektrophorese ist eine kapillarelektrophoretische Methode, bei der die Mobilitätsveränderungen der Analyten nach der erfolgten Wechselwirkung mit den Liganden gemessen und ausgewertet werden. Je stärker die untersuchten Analyten mit den Liganden interagieren, desto stärker ausgeprägt wird die Mobilitätsveränderung der Analyten sein [3,4].

### 2.2.2 Datenauswertung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Der einzige Parameter, der zur Berechnung der Wechselwirkungen zwischen den Liganden und Proteinen in der Mobility Shift Affinitätskapillarelektrophorese verwendet wird, ist die Migrationszeit der Protein-Ligand-Komplexe. Durch die Wechselwirkung der Proteine mit den Liganden ändert sich die Gesamtladung der Proteine, und demzufolge verändert sich die Migrationszeit des untersuchten Proteins [3,4] (siehe Abbildung 2-3).

In dieser Arbeit erfolgte die Berechnung der Interaktionsstärke folgendermaßen: Zuerst wurde die normalisierte Migrationszeit des Proteins unter Verwendung des Verhältnisses der Protein-Migrationszeit ( $t_{\text{prot}}$ ) und der EOF-Marker Migrationszeit ( $t_{\text{EOF}}$ ) bestimmt [3,4] (siehe Formel 2-4).

$$R = \frac{t_{\text{EOF}}}{t_{\text{prot}}} \quad (2-4)$$

$R$ : Mobilitätsquotient  
 $t_{\text{EOF}}$ : Migrationszeit vom EOF-Marker [min]  
 $t_{\text{prot}}$ : Migrationszeit des Proteins [min]

Anschließend wurde die Differenz zwischen den Verhältnissen (R-Werte) des reinen Tris Puffers und des Liganden-haltigen Puffers auf den reinen Tris-Puffer normiert [3,4] (siehe Formel 2-5).

$$\frac{\Delta R}{R_f} = \frac{R_i - R_f}{R_f} \quad (2-5)$$

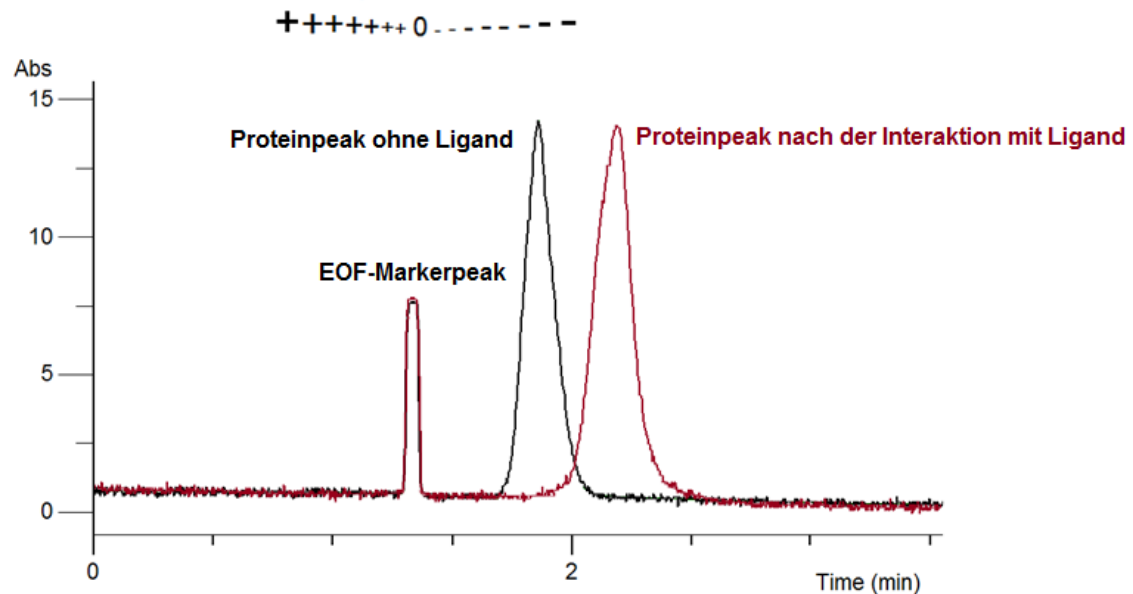
$\Delta R$ : Differenz der Mobilitätsquotienten  
 $R_i$ : Mobilitätsquotient in Gegenwart einer Ligandenkonzentration  
 $R_f$ : Mobilitätsquotient im puren Laufpuffer

In dieser Formel ist  $R_f$  das Mobilitätsverhältnis der Migrationszeit des EOF-Markers ( $t_{eof}$ ) und des Proteins ( $t_{prot}$ ) ohne Zugabe eines Liganden.  $R_i$  ist das Mobilitätsverhältnis in Gegenwart einer definierten Ligandenkonzentration. Das Ergebnis der Gleichung  $\Delta R/R_f$  gibt die Gesamtladung des Komplexes durch sein Vorzeichen und seinen absoluten Wert an. Hat zum Beispiel der Wert ein negatives Vorzeichen, ist die Gesamtladung negativ. Ist der Absolutwert hoch, so ist der Komplex hoch geladen. Die Konfidenzintervalle für die Ergebnisse wurden nach der Formel 2-6 berechnet [3,4].

$$cnf\left(\frac{R_i - R_f}{R_f}\right) = \frac{R_i - R_f}{R_f} \pm \frac{t_{\alpha/2, n_1+n_2-2} * \sigma_{total} * \sqrt{\frac{2}{n_1 + n_2}}}{R_f} \quad (2-6)$$

$cnf((R_i-R_f)/R_f)$ : Konfidenzintervall der Differenz der Mobilitätsquotienten  
 $t_{\alpha/2, n_1+n_2-2}$ : Student-t-Verteilung  
 $\alpha$ : Irrtumswahrscheinlichkeit  
 $n_1$ : Stichprobenumfang einer Versuchsserie (1)  
 $n_2$ : Stichprobenumfang einer Versuchsserie (2)  
 $\sigma_{total}$ : totale Standardabweichung

Diese Art der Interaktionsberechnung hat sich im Arbeitskreis durch mehrere Doktoranden etabliert und präzise Ergebnisse geliefert [3,4].



2-3 Darstellung der Mobility Shift Affinitätskapillarelektrophorese. Schwarz: Proteinpeak ohne Zusatz von Liganden; Rot: Proteinpeak nach der Interaktion mit bestimmten Liganden.

## 2.3 Wechselwirkungsuntersuchung verschiedener Liganden mittels ACE

### 2.3.1 Metallionen

Die Tatsache, dass Metallionen in lebenden Organismen eine wichtige Rolle spielen, ist nach dem heutigen Stand des Wissens kaum zu übersehen. Viele Metallionen sind wichtige Bestandteile zahlreicher Enzyme. Viele Metallionen sind außerdem für den Mineralhaushalt und die pH-Einstellung im lebenden Organismus essentiell. Metallionen können allerdings toxisch für den Körper sein und schädliche Auswirkungen auf verschiedenen Proteine und Enzyme im Körper aufweisen. Dies gilt zum Beispiel für viele Schwermetalle [5].

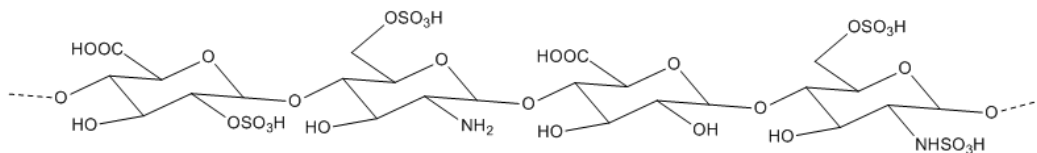
In dieser Arbeit wurden die sechs Metallionen  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  ausgewählt und auf ihre Wechselwirkungen mit ausgewählten Peptiden untersucht.

### 2.3.2 Heparinoide als Arzneistoffe

#### 2.3.2.1 Heparin

Heparin ist ein endogenes Glycosaminoglycan, das eine hemmende Wirkung auf die Koagulationskaskade hat. Heparinmoleküle bestehen aus unverzweigten Ketten von sulfatierten Sacchariden, die hauptsächlich

Glucosamin, Glucuron- und Iduronsäuren enthalten (siehe Abbildung 2-4). Das mittlere Molekulargewicht von Heparin beträgt 16000 Da. Aufgrund der großen Anzahl an Carboxyl- und Sulfatgruppen im Heparinmolekül ist Heparin unter physiologischen Bedingungen stark negativ geladen und bildet dann Komplexe mit basischen Proteinen, zum Beispiel mit seinem Antagonist Protamin [6].



2-4 Struktur von Heparin. Quelle: Eigene Darstellung.

#### 2.3.2.2 Enoxaparin-Natrium

Enoxaparin-Natrium gehört zu den niedermolekularen Heparinoiden, d.h. es hat die gleichen Strukturelemente wie Standard-Heparin, jedoch hat es ein niedrigeres mittleres Molekulargewicht (4500 Da) als Heparin. Die Polysaccharidketten sind Blöcke aus Glucosamin und Uronsäure, die glykosidisch verknüpft sind. Die Ketten bestehen aus 4 bis 24 Monomeren. Enoxaparin-Natrium hemmt einen wichtigen Gerinnungsfaktor, nämlich Faktor Xa [6].

#### 2.3.2.3 Fondaparinux

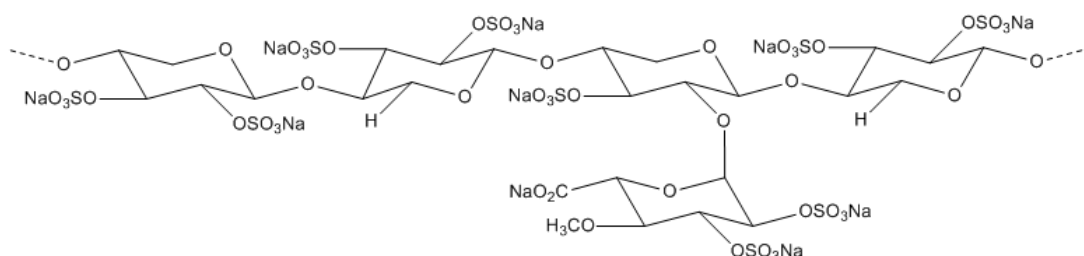
Das antithrombotisch wirksame Pentasaccharid Fondaparinux (ca. 1700 Da) ist ein synthetisch hergestellter, selektiver Hemmer des Gerinnungsfaktors (Xa). Chemisch gesehen besteht Fondaparinux aus den pharmakophorischen fünf Saccharid-Einheiten im Heparinmolekül, die für genau diese Hemmung des Gerinnungsfaktors Xa verantwortlich sind. Fondaparinux trägt jedoch eine Sulfatgruppe (an der ersten Saccharid-Einheit) mehr. Im Gegensatz zu Heparin hat Fondaparinux keine pharmakologische Wirkung auf Thrombin [6].

#### 2.3.2.4 Natrium-Pentosanpolysulfat (PPS)

Pentosanpolysulfat ([[(2R,3R,4S,5R)-2-Hydroxy-5-[(2S,3R,4S,5R)-5-hydroxy-3,4-disulfooxyoxan-2-yl]oxy-3-sulfooxyoxan-4-yl]-hydrogensulfat, Natrium) [7] ist ein hochsulfatiertes halbsynthetisches polyanionisches Mukopolysaccharid mit



einer heparin-ähnlichen Molekülstruktur [8–10] (siehe Abbildung 2-5). Sein Molekulargewicht beträgt ca. 5000 Da [10–12]. Pentosanpolysulfat (PPS) hat für seinen anionischen Charakter mehr ionisierbare Gruppen pro Monomereinheit als Heparin [13]. Das Polysaccharid-Grundgerüst von PPS wird aus dem Holz von Buchenbäumen (*Fagus sylvatica*) [14] extrahiert und dann mit einem Sulfatierungsmittel, z.B. Chlorsulfonsäure behandelt damit die Polysaccharid-OH Gruppen verestert werden [9,12]. Danach wird Pentosanpolysulfat mit Natriumhydroxid verarbeitet, um ein Natriumsalz zu gewinnen [10,12]. PPS besteht aus der wiederholten linearen Einheiten von (1-4) -verknüpften  $\beta$ -D-Xylanopyranosen, bei denen  $\alpha$ -D-4 Methylglucopyranosyluronsäure-Einheiten im Durchschnitt mit der zweiten Position jeder zehnten Xylanopyranose-Einheit glykosidisch verknüpft sind [7,9,11]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass PPS zahlreiche pharmakologische Effekte besitzt. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Heparin hat PPS antikoagulierende und fibrinolytische Eigenschaften [7,9]. Es wird auch in der Veterinärmedizin als entzündungshemmendes Medikament zur Behandlung von Arthritis eingesetzt [7,15]. Oral verabreichtes PPS wird bei der Therapie der interstitiellen Zystitis (IC) eingesetzt, um die Blasenschmerzen zu lindern [7,14,16,17]. Weiterhin kann PPS als Antagonist von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) verwendet werden. In-vitro Experimente haben außerdem gezeigt, dass PPS eine Vielzahl von Heparin-Bindungswachstumsfaktoren, die aus Tumorzellen entnommen wurden, hemmen kann [7,18]. Darüber hinaus wurden HIV-1-Viruszell-Adsorptions-inhibierende Eigenschaften von PPS berichtet [8,14].



2-5 Struktur von PPS. Quelle: Eigene Darstellung.

### 3 Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK)

#### 3.1 Struktur und Eigenschaften von ERK

ERK ist die Abkürzung für „*extracellular-signal regulated kinases*“. Diese Kinasen gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen, das sind Enzyme, die zu den Proteinkinasen gezählt werden und Serin- oder Threoninreste in bestimmten Proteinen phosphorylieren [19,20]. ERK gehören zu der Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen). Es existieren 8 Isoformen von ERK, von denen an ERK 1 und ERK 2 am meisten geforscht wird [21–23].

Biologische Systeme verwenden häufig Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungszyklen zur Transduktion von Informationen als Antwort auf äußere Reize. Der Kern dieses Prozesses ist eine reversible Phosphorylierung eines Zielproteins, die durch eine Kinase bewirkt wird. Der ERK / MAP-Kinase-Signalweg ist ein Beispiel solcher Prozesse [24].

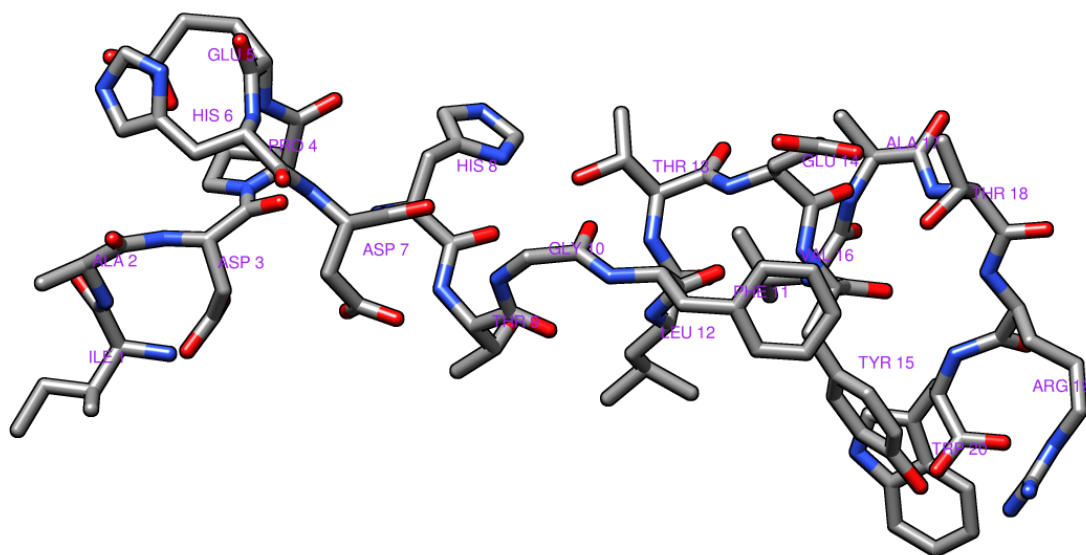
ERK spielen bei biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Zellzyklus-Progression eine zentrale Rolle. Die starke mitogene Wirkung ist dafür verantwortlich, dass diese Enzyme zu den Proto-Onkogenen gehören, da ein hohes mitogenes Potential dazu führt, dass Zellen leichter onkogen entarten [20,24]. Aus diesem Grund konnte eine Störung des ERK / MAP-Kinase-Signalweges bei verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden [25]. Daher sind die Interaktionsuntersuchungen dieser wichtigen Enzyme mit verschiedenen Liganden nicht nur zum Verständnis der Krebsentstehung, sondern auch zur Behandlung verschiedener Krebsarten wesentlich.

In diesem Abschnitt wurden die Interaktionen von einem ERK 1- Peptid mit verschiedenen ausgewählten Metallionen untersucht. Es ist lange bekannt, dass Metallionen für die Aktivierung von ERK-Proteinen eine wichtige Rolle spielen. In letzter Zeit sind in diesem Zusammenhang auch die z.B in Kosmetika enthaltenen Metalloxid-Nanopartikel in den Mittelpunkt des Interesses gerückt [26,27].

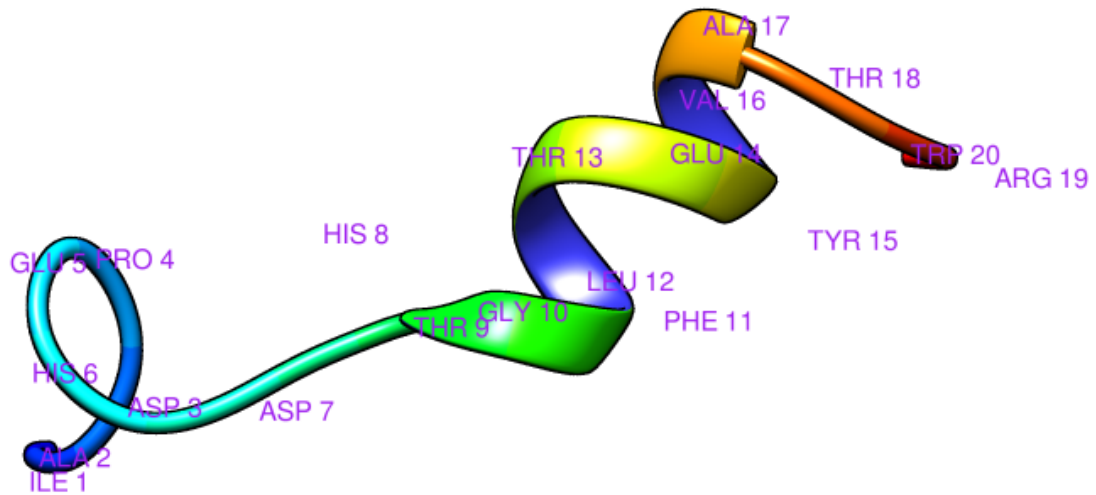
### 3.2 Versuchsaufbau, untersuchtes ERK-Peptid und Metallionen

Aufbauend auf der Arbeit von Frau Dr. Sabine Redweik [4] sollten die Interaktionen von synthetisch hergestellten ERK 1-Peptiden (siehe Abschnitt 11.3.1) mit sechs ausgewählten Metallionen untersucht werden (siehe Abschnitt 11.3.1).

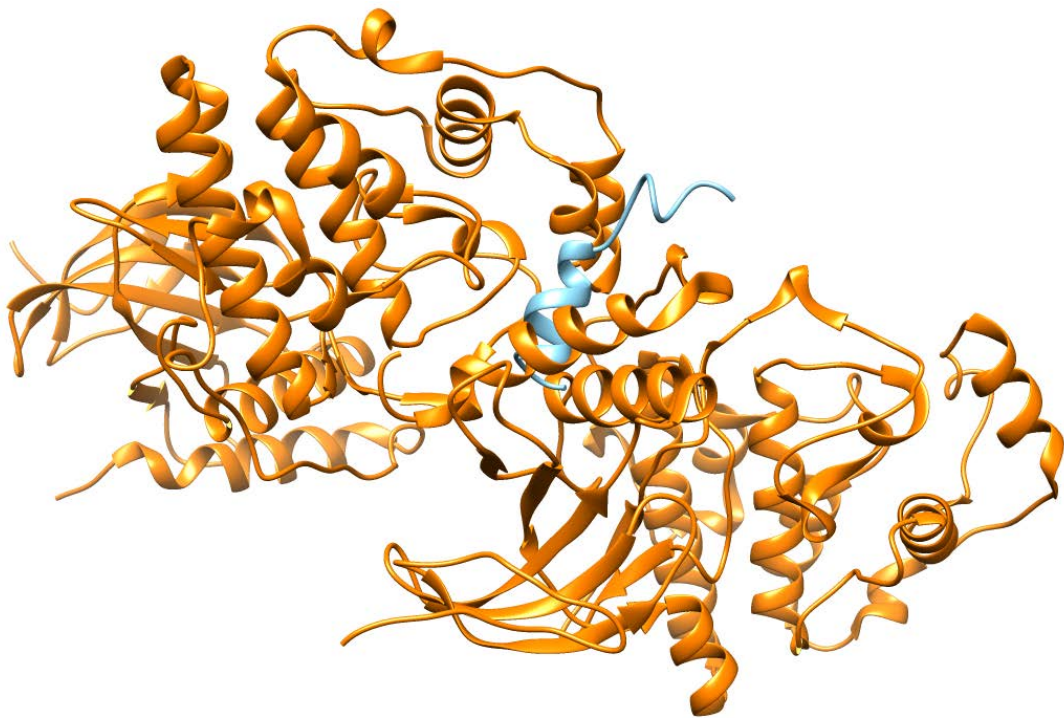
ERK 1-Protein ist ein relativ großes Protein mit 379 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 43 kDa [19,25]. Aufgrund der Komplexität molekularer Wechselwirkungen werden häufig vereinfachte Peptidmodelle eingesetzt, die sich als nützlich für die Untersuchung der Wechselwirkungsphänomene erwiesen haben. Ein synthetisches Peptid aus der Aktivierungsschleife des Signalproteins ERK 1, bestehend aus 19 Aminosäuren, wurde aus diesem Grund für die Wechselwirkungsuntersuchungen herangezogen (siehe Abbildungen 3-1, 3-2 und 3-3).



3-1 Aminosäuresequenz von dem untersuchten ERK 1-Peptid



3-2 Sekundärstruktur des untersuchten ERK 1-Peptids



3-3 Aktivierungsschleife von dem Signalprotein ERK 1, Gold: ERK 1-Protein, Hellblau: synthetisch hergestelltes ERK 1-Peptid.

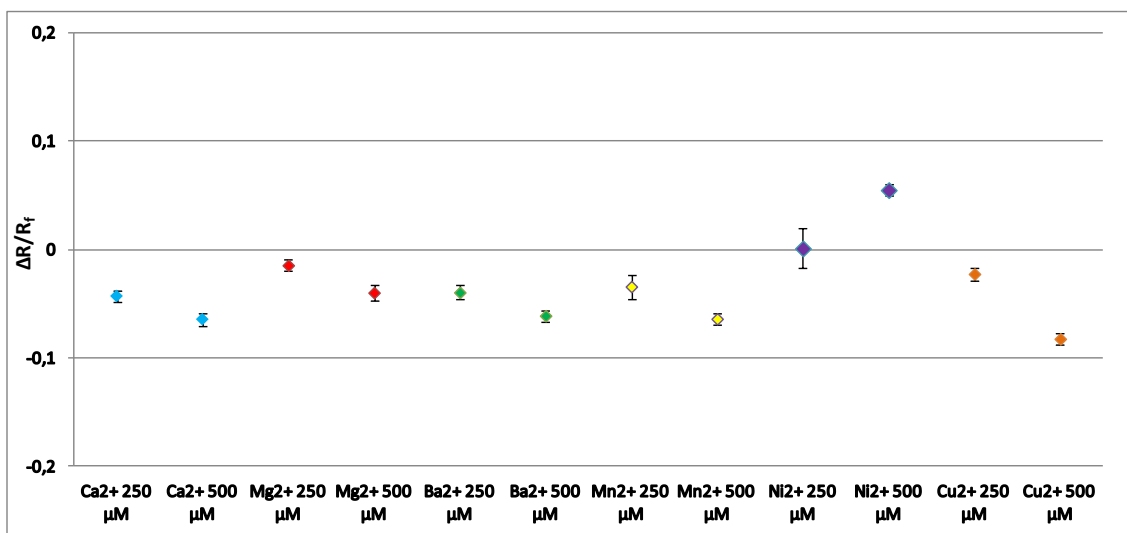
Zuerst wurden die Wechselwirkungen der unphosphorylierten Form des Peptides mit den Metallionen  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  untersucht. Daraufhin wurden die Ergebnisse dieser Wechselwirkungen mit den Wechselwirkungen der mono- und diphosphorylierten Formen des synthetischen ERK 1-Peptides mit den erwähnten Metallionen verglichen.

Im Anschluss wurde der Einfluss der Spülungsprotokolle mit-und ohne EDTA auf die Interaktionen dieses Peptides mit  $\text{Ni}^{2+}$  untersucht, da  $\text{Ni}^{2+}$  eine Besonderheit bei den Interaktionsuntersuchungen darstellte.

Die affinitätskapillarelektrophoretische Methode, die zu diesen Untersuchungen angewendet wurde, ist dem Abschnitt 11.3.1 zu entnehmen.

### 3.3 Ergebnisse

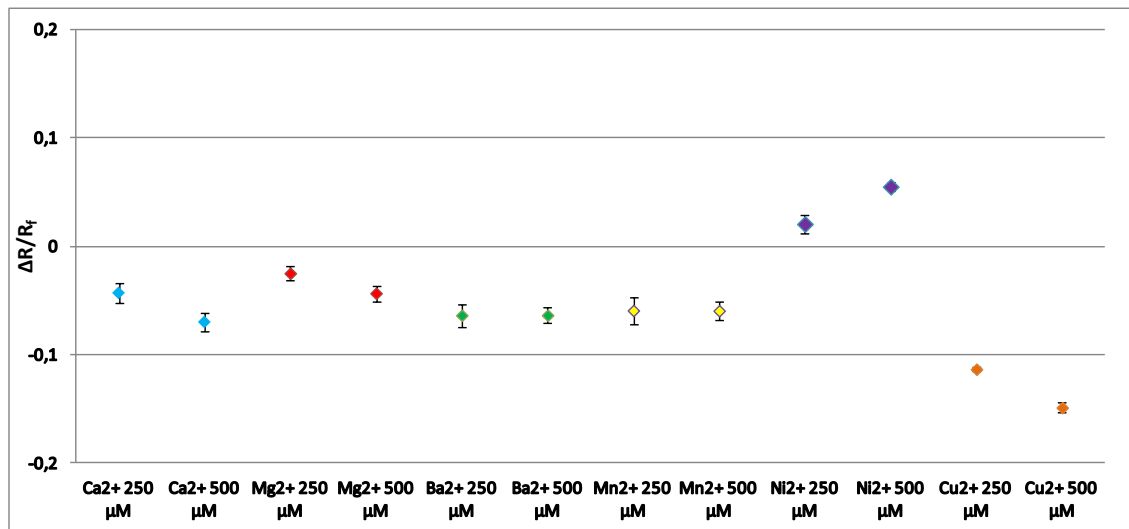
Die Ergebnisse der Interaktionsuntersuchungen des unphosphorylierten ERK 1-Peptides mit den sechs ausgewählten Metallionen sind in der Abbildung 3-4 dargestellt.



3-4 Interaktionen der unphosphorylierten Form des ERK 1-Peptides mit sechs ausgewählten Metallionen, jeweils in den Konzentrationen 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ .

Anhand der Abbildung 3-4 ist Folgendes erkennbar: das unphosphorylierte ERK 1-Peptid weist mit allen eingesetzten Metallionen in der höheren Konzentration (500  $\mu\text{M}$ ) eine signifikante Wechselwirkung auf. Die Interaktionen mit  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  sind dabei nicht so stark ausgeprägt wie die mit  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ . Außerdem sind die  $\Delta R/R_f$ -Werte von  $\text{Ni}^{2+}$ -Wechselwirkungen in die positive Richtung verschoben, was auf einer kürzeren Migrationszeit und einer höheren Mobilität des unphosphorylierten ERK 1-Peptides nach der Interaktion mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beruht.

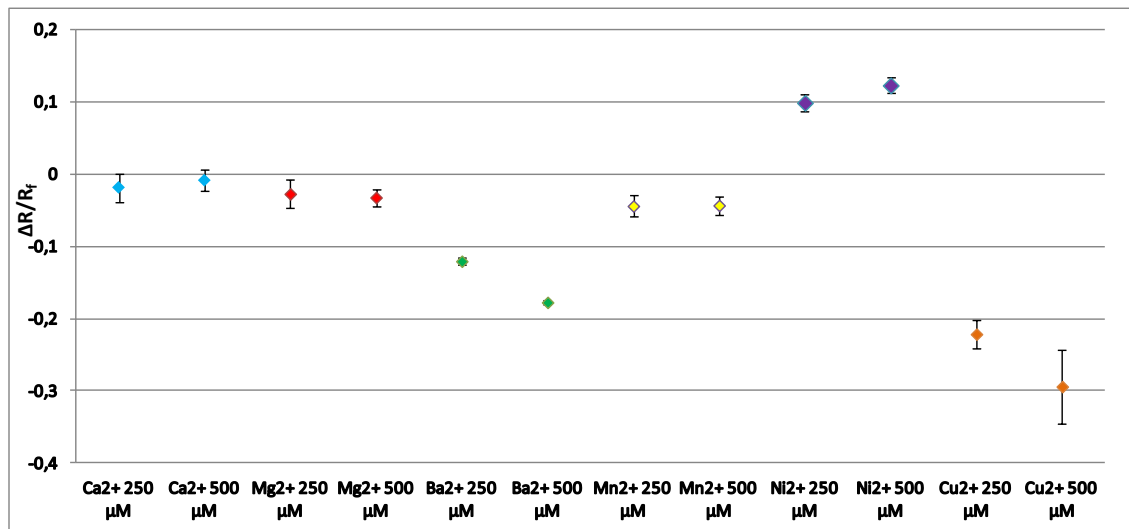
Desweiteren wurden die Interaktionen des monophosphorylierten ERK 1-Peptides mit den gleichen Metallionen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind der Abbildung 3-5 zu entnehmen.



3-5 Interaktionen der monophosphorylierten Form des ERK 1-Peptides mit sechs ausgewählten Metallionen, jeweils in den Konzentrationen 250 µM und 500 µM.

Das Interaktionsverhalten des monophosphorylierten ERK 1-Peptid mit den ausgewählten Metallionen ist im Allgemeinen vergleichbar mit dem von unphosphoryliertem ERK 1-Peptid. Die Wechselwirkungen mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> sind bei der höheren Metallionenkonzentration (von 500 µM) etwas stärker ausgeprägt als bei der von 250 µM. Bei Ba<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> sind die Interaktionen der beiden Metallionenkonzentrationen mit dem monophosphorylierten ERK 1-Peptid etwa gleich stark. Eine stärkere Wechselwirkung mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen ist ebenfalls eindeutig erkennbar. Betrachtet man die Wechselwirkungen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen, erkennt man wie bei dem unphosphoryliertem ERK 1-Peptid, eine Positivverschiebung der Wechselwirkungen.

Anschließend wurden die Wechselwirkungen der diphosphorylierten Form des ERK 1-Peptides mit den gleichen Metallionen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 3-6 dargestellt.

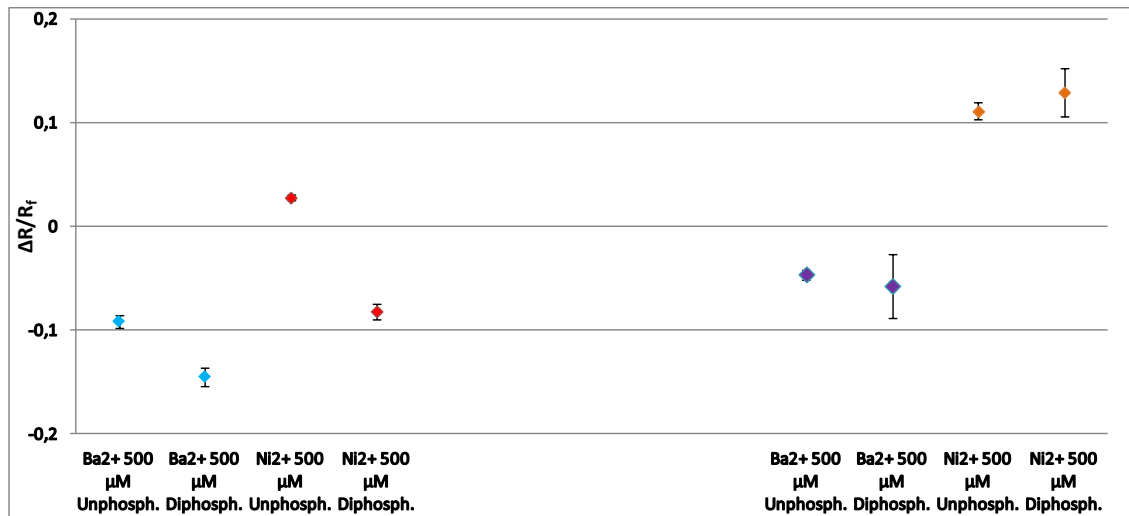


3-6 Interaktionen der diphosphorylierten Form des ERK 1-Peptides mit sechs ausgewählten Metallionen, jeweils in den Konzentrationen 250  $\mu$ M und 500  $\mu$ M.

Eindeutig erkennbar ist eine sehr starke Wechselwirkung des diphosphorylierten ERK 1-Peptides mit den Cu<sup>2+</sup>-Ionen, insbesondere in der Konzentration von 500  $\mu$ M. Außerdem sind die Wechselwirkungen mit Ba<sup>2+</sup>-Ionen in der Konzentration von 500  $\mu$ M ebenfalls stärker geworden. Betrachtet man die Interaktionen des diphosphorylierten ERK 1-Peptids mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup>, erkennt man keine Zunahme der Interaktionsstärke. Im Falle von Ni<sup>2+</sup>-Ionen, sind die Wechselwirkungen in die positive Richtung verschoben, wie es bei un- und monophosphoryliertem ERK 1-Peptid der Fall war.

Da anhand der Vorarbeiten, insbesondere von Frau Dr. Redweik bekannt war, dass Proteine nach der Wechselwirkung mit Metallionen aufgrund einer Komplexbildung der Metallionen mit weiteren Anionen des Reaktionsmilieus meist insgesamt negativer werden [4], wurde versucht, das gegensätzliche Verhalten des ERK 1-Peptides nach der Interaktion mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu ergründen. Zu diesem Zweck wurden zwei Untersuchungsserien mit 2 verschiedenen Spülprotokollen durchgeführt, und zwar einmal nur mit NaOH (altes Spülprotokoll von Frau Dr. Redweik) und einmal mit NaOH + EDTA (aktuelles Spülprotokoll der Metallionenuntersuchungen im Arbeitskreis Wätzig). Die genaue Durchführung der Affinitätskapillarelektrophoretischen Methode ist im Abschnitt 11.3.1 beschrieben. Bei diesen Untersuchungsserien wurde ein weiteres Metallion, Ba<sup>2+</sup> zusätzlich zu Ni<sup>2+</sup> als Kontrolle verwendet und die Interaktionsuntersuchungen von un- und diphosphoryliertem ERK 1-Peptid mit

den beiden Metallionen nur in der Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 3-7 dargestellt.



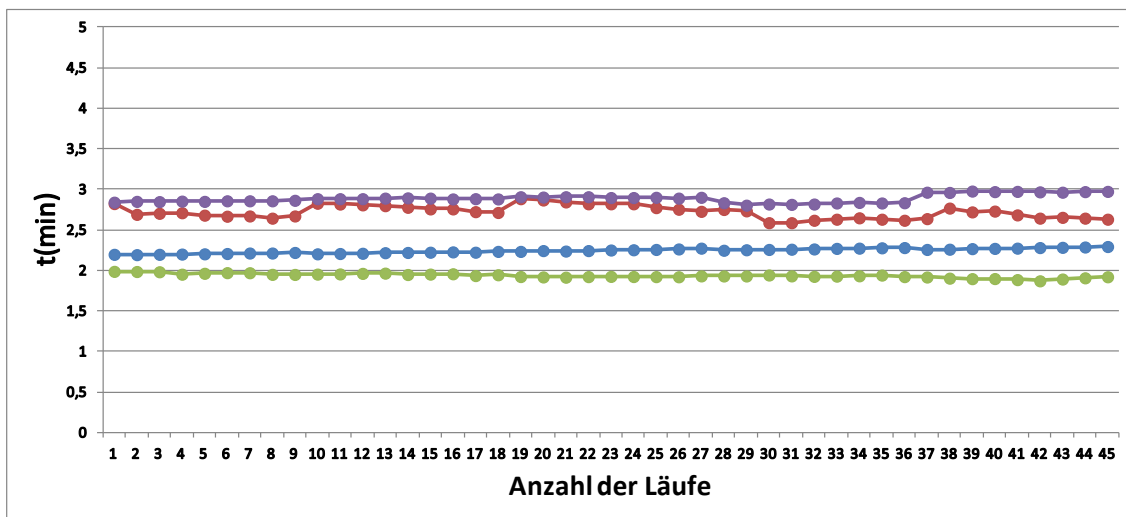
3-7 Interaktionen der un- und diphosphorylierten Form des ERK 1-Peptides mit  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ , in der Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  nach dem alten (links, blau und rote Punkte, nur mit NaOH) und dem neuen (rechts, lila und orange Punkte, mit NaOH + EDTA) Spülprotokoll.

Auf der linken Seite dieser Abbildung (3-7) sind die Ergebnisse der Interaktionsuntersuchungen nach dem alten Spülprotokoll dargestellt. Eindeutig zu erkennen ist, dass die Interaktionen des diphosphorylierten ERK 1-Peptid sowohl mit  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen als auch mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen stark ausgeprägt sind und einen  $\Delta R/R_f$ -Wert im negativen Bereich aufweisen. Betrachtet man die Ergebnisse der Interaktionsuntersuchungen, die nach dem aktuellen Spülprotokoll durchgeführt wurden (rechte Seite in der Abbildung 3-7), erkennt man, dass sich wie bei den bisherigen Ergebnissen eine Positivverschiebung der  $\Delta R/R_f$ -Werte nach der Interaktion mit den  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen ergibt.

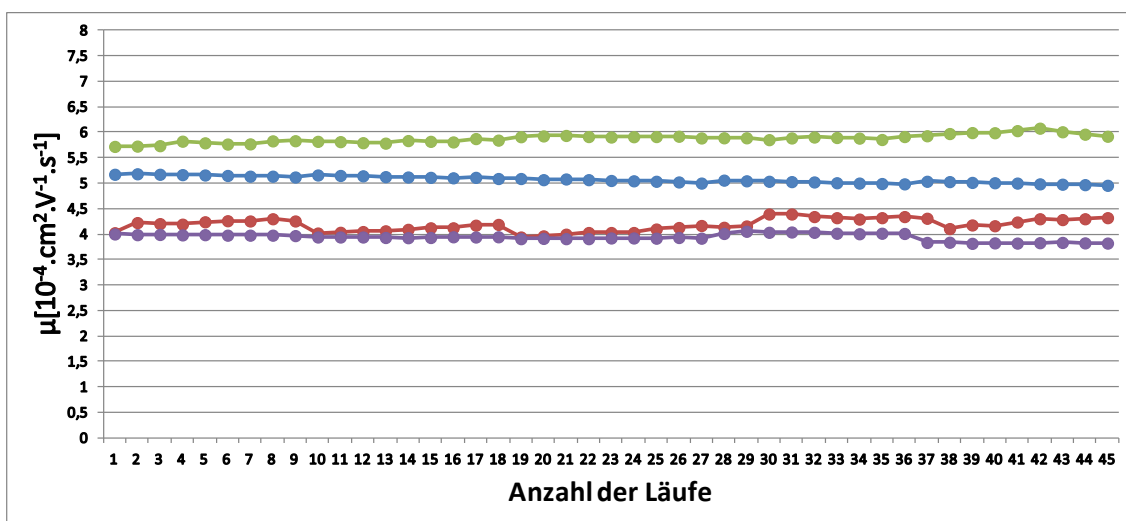
Nach dem Erhalt unterschiedlicher Ergebnisse je nach verwendetem Spülprotokoll, wurde der Einfluss von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen auf die Interaktionsergebnisse weiter untersucht. Es ist bekannt, dass viele Metallionen, vor allem Schwermetalle dazu neigen, an der Kapillarwand zu adsorbieren [3]. Zwischen den sechs untersuchten Metallionen, haben  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen die größte Affinität, an der Kapillarwand zu binden [3]. Aus diesem Grund wurde in einer separaten Untersuchungsserie der Einfluss dieser beiden Ionen auf den EOF untersucht. Insgesamt wurden vier Untersuchungsreihen pro Metallion, bestehend je aus 45 Läufen durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurde



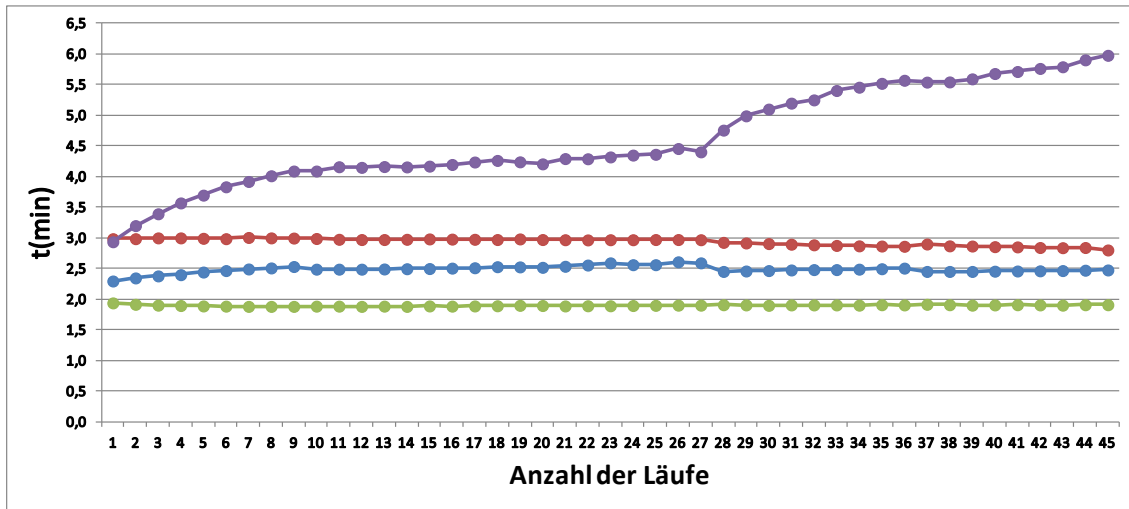
Acetanilid als EOF-Marker eingesetzt. Auf der einen Seite wurden die Migrationszeiten und die Mobilität vom Acetanilid unter dem Einfluss von NaOH-Spülung und NaOH + EDTA-Spülung ermittelt. Auf der anderen Seite wurde dem Laufpuffer  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen bzw.  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen zugesetzt und ebenfalls die Migrationszeiten und Mobilität vom Acetanilid unter dem Einfluss der beiden Spülprotokolle und dem eingesetzten Metallion ermittelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildungen 3-8 bis 3-11 dargestellt.



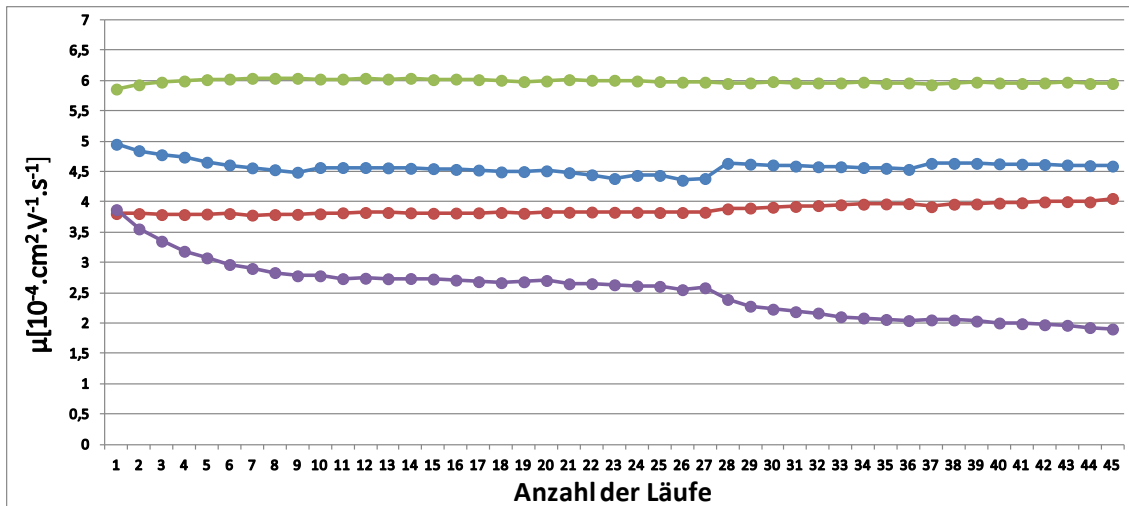
3-8 Migrationszeiten vom Acetanilid; Grün: Acetanilid ohne Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen NaOH-Spülung, Lila: Acetanilid mit dem Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im Laufpuffer NaOH-Spülung, Blau: Acetanilid ohne Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen NaOH + EDTA-Spülung, Rot: Acetanilid mit dem Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im Laufpuffer NaOH + EDTA-Spülung.



3-9 Mobilität vom Acetanilid; Grün: Acetanilid ohne Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen NaOH-Spülung, Lila: Acetanilid mit dem Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im Laufpuffer NaOH-Spülung, Blau: Acetanilid ohne Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen NaOH + EDTA-Spülung, Rot: Acetanilid mit dem Zusatz von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im Laufpuffer NaOH + EDTA-Spülung.



3-10 Migrationszeiten vom Acetanilid; Grün: Acetanilid ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen NaOH-Spülung, Lila: Acetanilid mit dem Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen im Laufpuffer NaOH-Spülung, Blau: Acetanilid ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen NaOH + EDTA-Spülung, Rot: Acetanilid mit dem Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen im Laufpuffer NaOH + EDTA-Spülung.



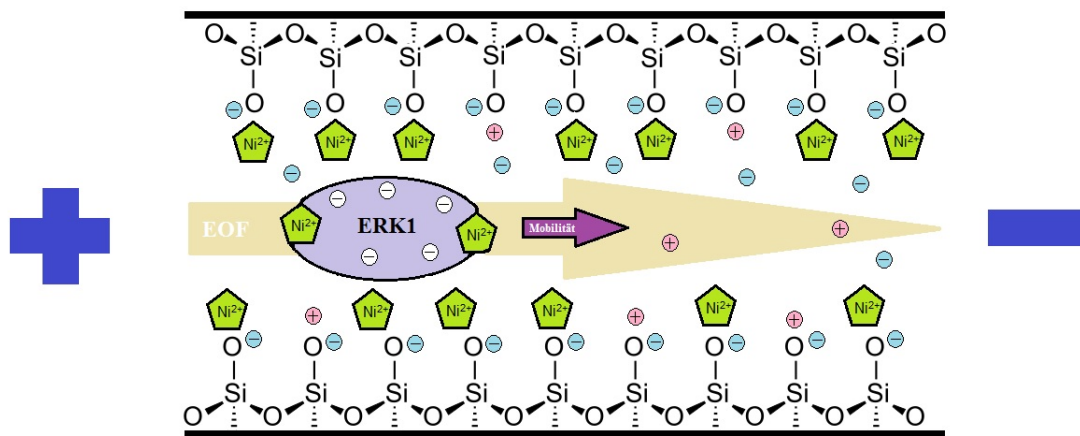
3-11 Mobilität vom Acetanilid; Grün: Acetanilid ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen NaOH-Spülung, Lila: Acetanilid mit dem Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen im Laufpuffer NaOH-Spülung, Blau: Acetanilid ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen NaOH + EDTA-Spülung, Rot: Acetanilid mit dem Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen im Laufpuffer NaOH + EDTA-Spülung.

Anhand dieser Abbildungen ist eindeutig zu erkennen, dass sich der EOF unter dem Einfluss von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen am meisten verändert hat, wenn nur NaOH-Lösung zur Spülung verwendet wird. In diesem Fall nahm die Migrationszeit vom Acetanilid, vor allem ab Lauf 27, stark zu und demzufolge die Mobilität ab.

Aus diesen Untersuchungen kann man folgende Schlussfolgerung ziehen:  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen adsorbieren stark an der Kapillarwand und können mit einer reinen NaOH-Lösung nicht von der Kapillarwand herunter gespült werden. Erst nach dem Zusatz von EDTA und der damit möglichen Bildung von  $\text{Ni}^{2+}$ -EDTA-

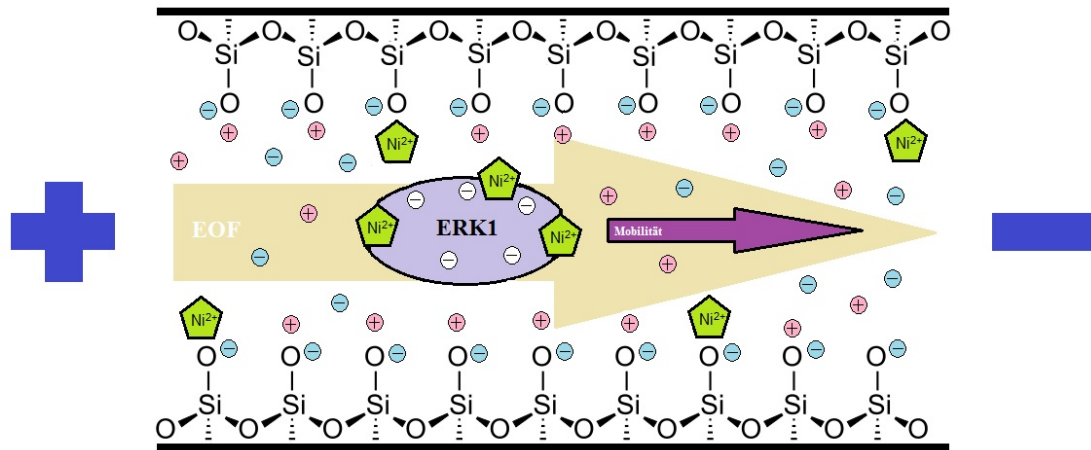
Komplexen können die adsorbierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen von der Kapillarwand abgelöst werden.

Aufbauend auf diesen Untersuchungen könnte folgende Erklärung für die von den anderen Metallionen abweichenden Ergebnisse der Interaktionsuntersuchungen zwischen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen und ERK 1-Peptid in Betracht gezogen werden: Ohne Zusatz von EDTA in der Spüllösung können die adsorbierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen nicht vollständig von der Kapillarwand herunter gespült werden und bleiben zum großen Teil gebunden. Das bei pH 7,4 negativ geladene ERK 1-Peptid tritt dann in Wechselwirkung mit den adsorbierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen an der Kapillarwand. Zusätzlich nimmt der EOF insgesamt ab und das führt im Ergebnis dazu, dass die Mobilität von ERK 1-Peptid abnimmt (siehe Abbildung 3-12).



3-12 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen vom ERK 1-Peptid mit den gebundenen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen an der Kapillarwand (ohne Zusatz von EDTA) und die Gesamtabnahme von EOF. Abnahme der Mobilität des ERK 1-Peptides. Quelle: eigene Darstellung.

Nachdem EDTA zu der NaOH-Lösung zugesetzt wird, werden die gebundenen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen von der Kapillarwand herunter gespült, die daraufhin injizierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen die sich im Laufpuffer befinden, können direkt mit dem ERK 1-Peptid interagieren und stark daran binden. Zusätzlich nimmt der EOF wegen der Spülung mit NaOH + EDTA insgesamt zu und das ganze Zusammenspiel führt dazu, dass die Mobilität von ERK 1-Peptid zunimmt und die  $\Delta R/R_f$ -Werte im positiven Bereich auftauchen (siehe Abbildung 3-13).



3-13 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen vom ERK 1-Peptid mit den neu injizierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen in die Kapillare (nach dem Zusatz von EDTA in die Spüllösung) und die Gesamtzunahme von EOF- und Mobilität des ERK 1-Peptides. Quelle: eigene Darstellung.

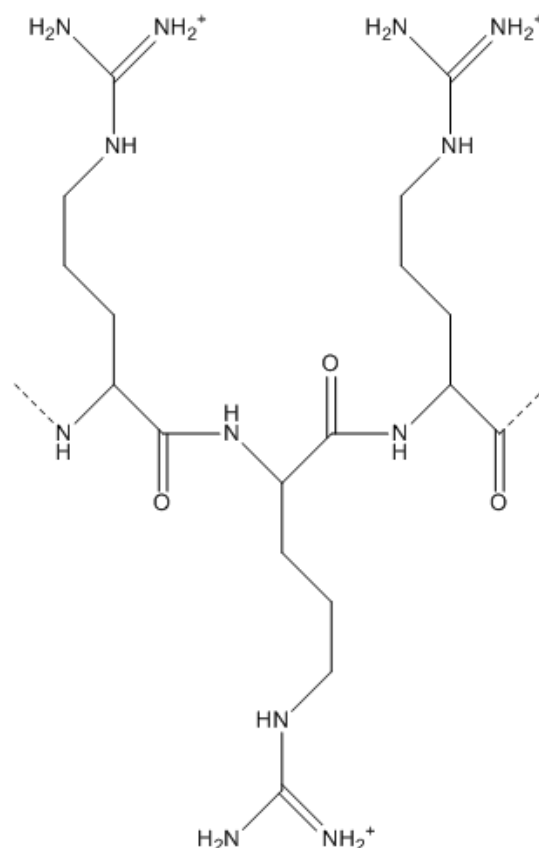
### 3.4 Zusammenfassung

Die in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungen haben am Beispiel des ERK 1-Peptides gezeigt, dass Affinitätskapillarelektrophorese eine geeignete Technik für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Metallionen und Peptiden darstellt. Eine Diphosphorylierung des ERK 1-Peptides hat einen großen Einfluss auf die Wechselwirkungen mit den Schwermetallionen  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ . Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es bei den Metallionen, die dazu neigen, stark an der Kapillarwand zu adsorbieren, notwendig ist, einen Komplexbildner (EDTA) zu der NaOH-Lösung hinzuzufügen. Besonders bei den  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen haben die Untersuchungen gezeigt, dass der Zusatz von EDTA einen starken Einfluss auf die Lage der  $\Delta R/R_f$ -Werte hat.

## 4 Ist ACE eine geeignete Methode zur Untersuchung von Heparinoid-Protein Wechselwirkungen? Eine Fallstudie am Beispiel von Affinitätsuntersuchungen zwischen Heparinoiden und Protamin

### 4.1 Protamin

Protamine sind eine Mischung aus niedermolekularen basischen Proteinen [28] mit einer relativen Molekülmasse von etwa 5000 Da [29,30]. Sie bestehen hauptsächlich aus basischen Aminosäuren, wie Arginin (siehe Abbildung 4-1) [30]. Außerdem kommen Alanin, Serin, Prolin, Valin, Glycin und Isoleucin als weitere Aminosäuren in Protaminen vor [29]. Protamine werden aus Spermien bestimmter Lachsarten durch Extraktion mit Mineralsäuren gewonnen [28,29,31] und sind hochgradig polykationische Proteine mit einem isoelektrischen Punkt (pI) zwischen 12 und 13 [30,32].



4-1 Teilstruktur von Protamin. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [33].

Eingesetzt werden Protamine als Salze, wie Protaminsulfat [32]. Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Protaminsulfat die Wirkung von Heparin aufheben kann, indem es durch die Bindung an Heparin einen schwerlöslichen Komplex bildet [29,34]. Der entstandene Komplex besitzt keine gerinnungshemmende Wirkung mehr. Aus diesem Grund wird Protaminsulfat als Antidot bei Überdosierungen von Heparin eingesetzt. Am häufigsten findet Protaminsulfat in chirurgischen Eingriffen am offenen Herzen zur Aufhebung der antikoagulativen Heparin-Wirkung Anwendung [32,33,35]. Protaminsulfat wird in der Stärke von 1 % zur Therapie verwendet [33,35]. Es wird angenommen, dass 1 mg Protaminsulfat 100 Heparin-Einheiten neutralisiert [28,33,36].

Um festzustellen, ob Untersuchungen von Heparinoid-Protein-Wechselwirkungen mittels Affinitätskapillarelektrophorese aussichtsreich sind, wurden in einem ersten Schritt die Wechselwirkungen zwischen Protaminsulfat und Heparinoiden als stark interagierendem Paar untersucht.

## **4.2 Eingesetzte Heparinoide**

Zur Durchführung der Experimente wurden zwei Heparinoide, nämlich Natrium-Pentosanpolysulfat (PPS) (siehe Abschnitt 2.3.2.4) und Enoxaparin-Natrium (siehe Abschnitt 2.3.2.2) eingesetzt. Bei diesen Untersuchungen wurden die Veränderungen des EOF beobachtet und ausgewertet. Da bekannt ist, dass Heparinoide und Protamin unlösliche Präzipitate bilden [34], wurde eine ausgewählte Heparinoid-Konzentration (20 mg/l) zuvor in die Protamin-Lösung (1 mg/ml) gegeben. Da keine Trübung infolge einer Fällung zu erkennen war, konnte somit festgestellt werden, dass die ausgewählte Konzentration für die Durchführung der ACE-Experimente geeignet ist. Ishihara et al. haben berichtet, dass niedermolekulares Heparin und Protamin in niedrigen Konzentrationen lösliche Nanopartikel aus Polyelektrolyt-Komplexen bilden, die keine Trübung verursachen [35].

Die Untersuchungen wurden in einer beschichteten LPA-Kapillare (siehe Abschnitt 11.1.2) unter Einsatz von Mesityloxid als EOF-Marker (siehe Abschnitt 11.2.2) und Acetat-Puffer (siehe Abschnitt 11.2.1) durchgeführt. Die

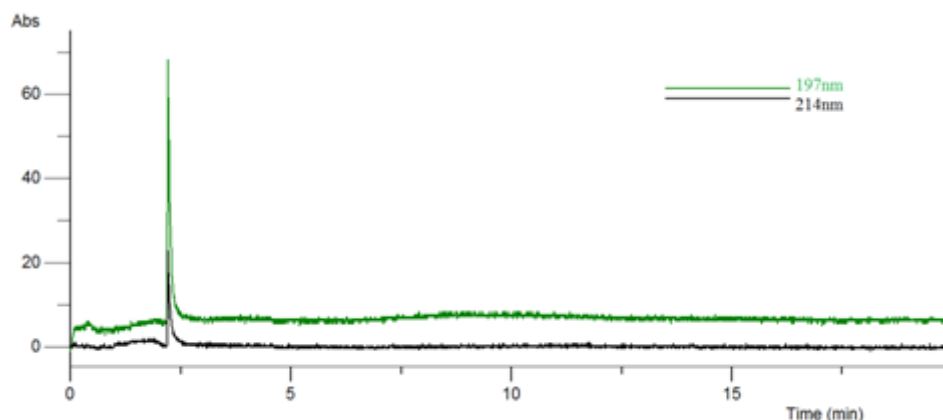
Elektropherogramme wurden bei 197 nm und 214 nm detektiert. Die Vorbereitungen der Heparinoid-Lösungen sind im Abschnitt 11.2.4 und die Trennbedingungen im Abschnitt 11.3.2 ausführlich beschrieben.

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Wechselwirkungen von PPS mit Protamin

Die Untersuchungen wurden mit den ausgewählten PPS-Konzentrationen von 5 mg/l, 10 mg/l und 20 mg/l durchgeführt, wobei die Ergebnisse von 20 mg/l PPS am besten auswertbar waren.

Da bekannt ist, dass das basische Protamin mit den sauren Silanolgruppen einer unbeschichteten Kapillare stark interagiert [37], wurde eine LPA-beschichtete Kapillare zur Durchführung der Experimente verwendet. In den beschichteten Kapillaren ist, wenn überhaupt, nur ein kleiner EOF zu erwarten, sodass es bei den ersten Messungen, die ohne Zusatz von PPS als Ligand durchgeführt wurden, nicht verwunderlich war, dass zwar der Protamin-Peak bei ca. 2,5 Minuten beobachtet wurde, aber kein Peak des EOF-Markers innerhalb der Messzeit zu erkennen war. Obwohl Protamin eine Mischung aus Proteinen darstellt, konnte nur ein scharfer Peak als Protamin-Peak nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-2).



4-2 Protamin-Peak ohne Zusatz von PPS als Ligand in 50 mM Acetat-Puffer pH 5,0.

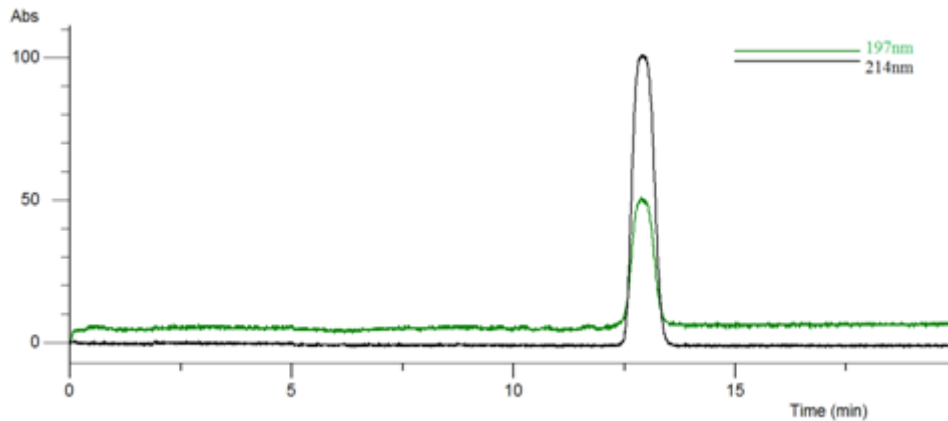
Nach dem Zusatz von PPS als Ligand zeigte das Elektropherogramm eine durchgreifende Änderung: der Protamin-Peak verschwand und stattdessen

tauchte ein Peak des EOF-Markers bei ca. 13 Minuten auf (siehe Abbildung 4-3). Diese Beobachtung lässt den fehlenden EOF-Peak im ersten Lauf (Abbildung 4-2) in anderem Licht erscheinen und kann folgendermaßen erklärt werden: Protamin wird trotz der LPA-Beschichtung an der Kapillarwand adsorbiert und zwar infolge hydrophober Wechselwirkungen. Derartige Wechselwirkungen für LPA-beschichtete Kapillare sind in der Literatur beschrieben [37]. Dadurch wird die Kapillarwand positiv aufgeladen, wobei ein EOF in umgekehrter Richtung zur Anode erzeugt wird und folglich kein Peak von dem EOF-Marker an der kathodischen Seite detektiert werden kann. Wird der negativ geladene polyanionische Ligand PPS zugesetzt, tritt er in elektrostatische Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Protamin, wodurch eine zweite, diesmal negativ geladene Schicht gebildet wird. Der EOF wird demzufolge kathodisch gerichtet sein und das Auftreten des EOF-Peaks in Abbildung 4-3 wird plausibel. Abramova et al. haben ähnliche Doppelschichtbildung von Protamin- und Heparin auf Siliciumdioxid-Oberflächen von impedimetrischen Mikrokapillar-Sensoren beschrieben, die zur Überwachung der Protamin-Heparin-Wechselwirkungen verwendet wurden [33]. Da die Wechselwirkungen zwischen Protamin und Heparinoiden irreversibel ist, kann daraus geschlossen werden, dass der injizierte PPS-Ligand einerseits an der Protamin-Schicht gebunden wird, und andererseits Komplexe mit noch freiem Protamin bildet, sodass kein Peak von freiem, nicht gebundenem und nicht komplexiertem Protamin detektiert werden kann.



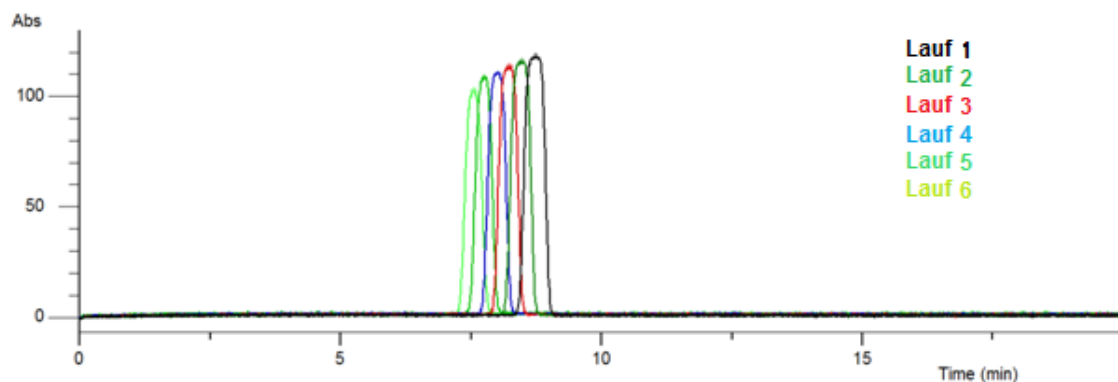
## Ist ACE eine geeignete Methode zur Untersuchung von Heparinoid-Protein Wechselwirkungen? Eine Fallstudie am Beispiel von Affinitätsuntersuchungen zwischen Heparinoiden und Protamin

---

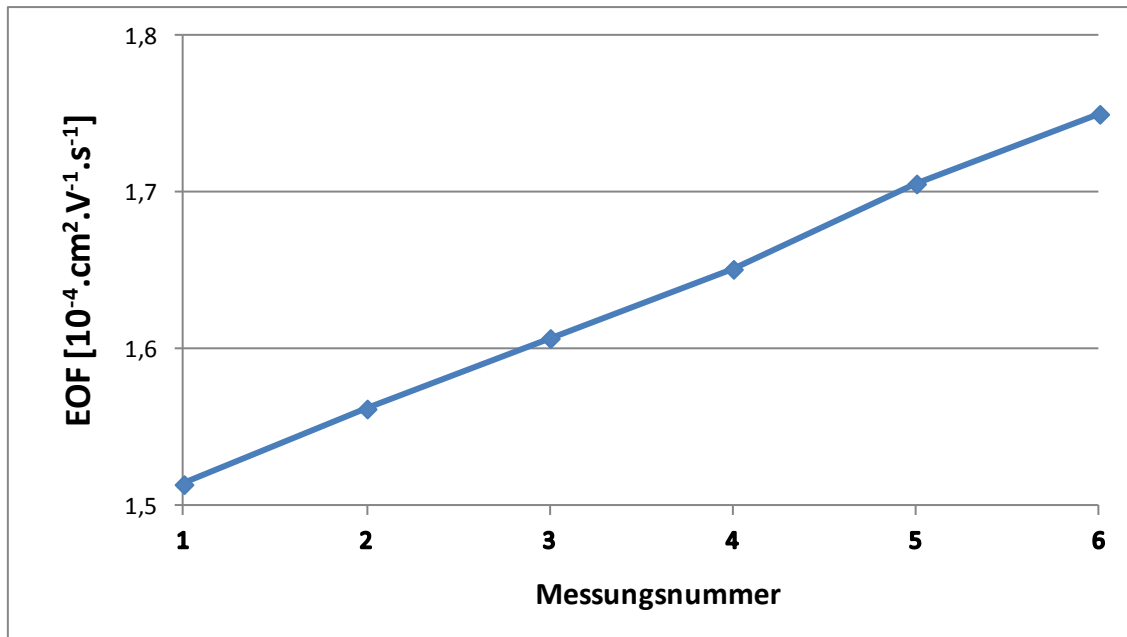


4-3 Mesityloxid-Peak erkennbar nach dem Zusatz von 20 mg/l PPS als Ligand in 50 mM Acetat-Puffer pH 5,0.

Ein weiterer Effekt, der bei diesen Experimenten beobachtet werden konnte, war eine Verstärkung des EOF vom ersten Lauf bis zum letzten Lauf bei den sechs durchgeführten Messungen. Die Zunahme vom EOF war durch Verringerung der Migrationszeit des EOF-Markers um ca. eine halbe Minute bei jedem Lauf bzw. eine Zunahme der berechneten Mobilität des EOF-Markers zu erkennen (siehe Abbildungen 4-4 und 4-5). Dieser Effekt weist vermutlich auf eine weiter fortlaufende, wechselseitige Ablagerung von Protamin- und PPS-Schichten auf der Kapillaroberfläche hin.



4-4 Mesityloxid-Peak von 6 aufeinanderfolgenden Messungen nach Zusatz von 20 mg/l PPS als Ligand in 50 mM Acetat-Puffer pH 5,0. Eine Zunahme von EOF ist durch eine Verringerung der Migrationszeit des Mesityloxids erkennbar.



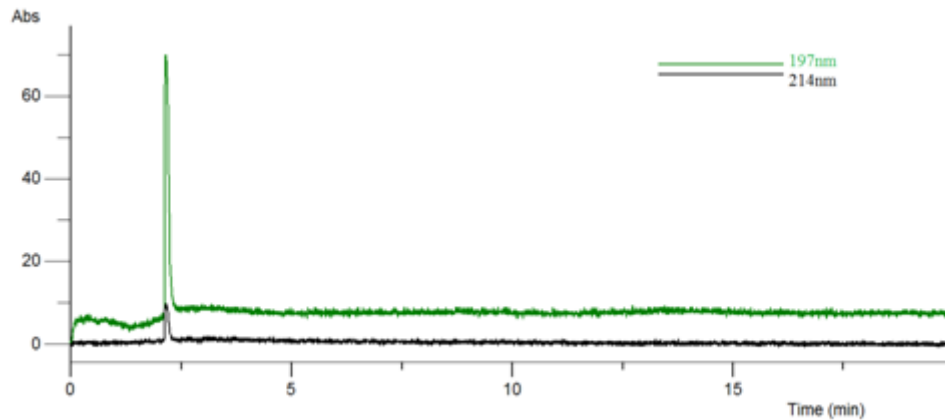
4-5 EOF-Marker-Mobilität nach Zusatz von 20 mg/l PPS als Ligand in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0.

#### 4.3.2 Wechselwirkungen von Enoxaparin-Natrium mit Protamin

Diese Untersuchungen wurden ebenfalls mit denselben Konzentrationen wie PPS, nämlich 5 mg/l, 10 mg/l und 20 mg/l Enoxaparin-Natrium anstelle von PPS durchgeführt, wobei auch hier die Ergebnisse von 20 mg/l Enoxaparin-Natrium am besten auswertbar waren. Außerdem wurden die experimentellen Bedingungen genauso gewählt wie bei den Untersuchungen, die mit PPS durchgeführt wurden. Ebenso wie bei den vorherigen PPS-Experimenten konnte auch in diesem Fall kein EOF-Marker-Peak ohne Zusatz von Enoxaparin-Natrium als Ligand nachgewiesen werden. Der Protamin-Peak erschien auch in diesem Fall bei ca. 2,5 Minuten (siehe Abbildung 4-6).

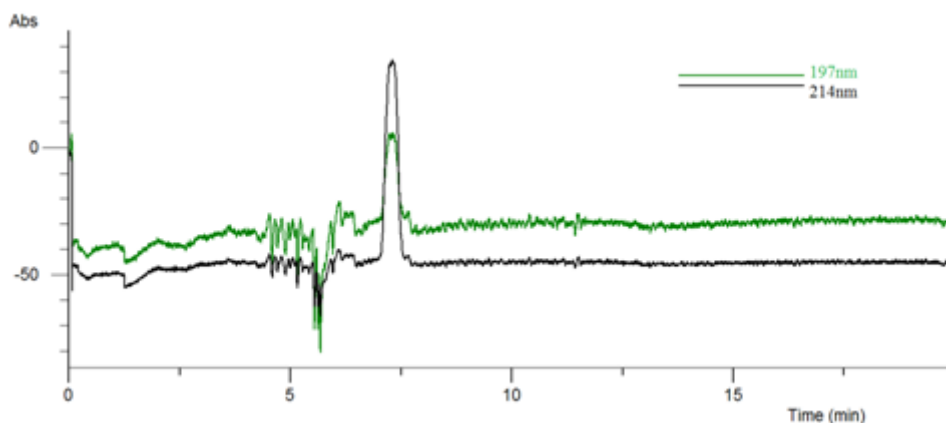
## Ist ACE eine geeignete Methode zur Untersuchung von Heparinoid-Protein Wechselwirkungen? Eine Fallstudie am Beispiel von Affinitätsuntersuchungen zwischen Heparinoiden und Protamin

---



4-6 Protamin-Peak ohne Zusatz von Enoxaparin-Natrium als Ligand in 50 mM Acetat-Puffer pH 5,0.

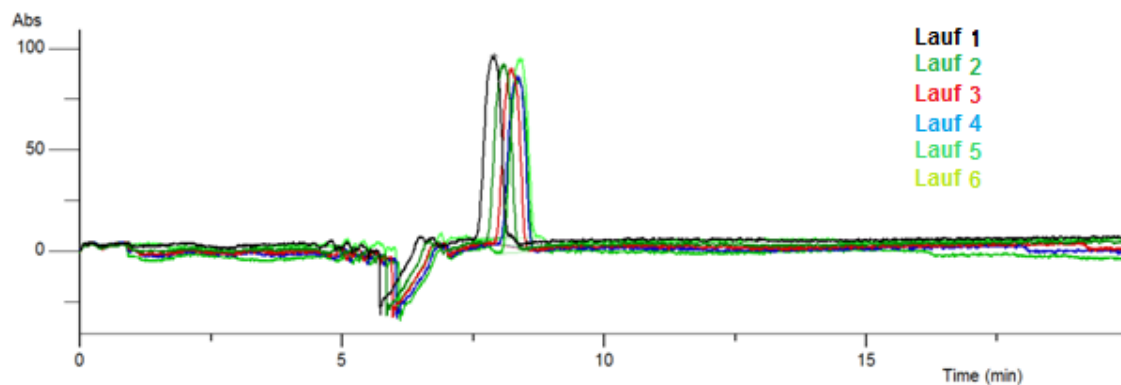
Nach Zusatz von Enoxaparin-Natrium war ebenfalls wie bei den PPS-Untersuchungen der EOF-Marker-Peak wieder detektierbar, aber im Gegensatz zu PPS verursachte die Zugabe von Enoxaparin-Natrium als Ligand ein typisches Muster, das zwischen 4 bis 6 Minuten erkennbar war und abhängig von der eingesetzten Konzentration von Enoxaparin-Natrium mehr oder weniger stark ausgeprägt war (siehe Abbildung 4-7).



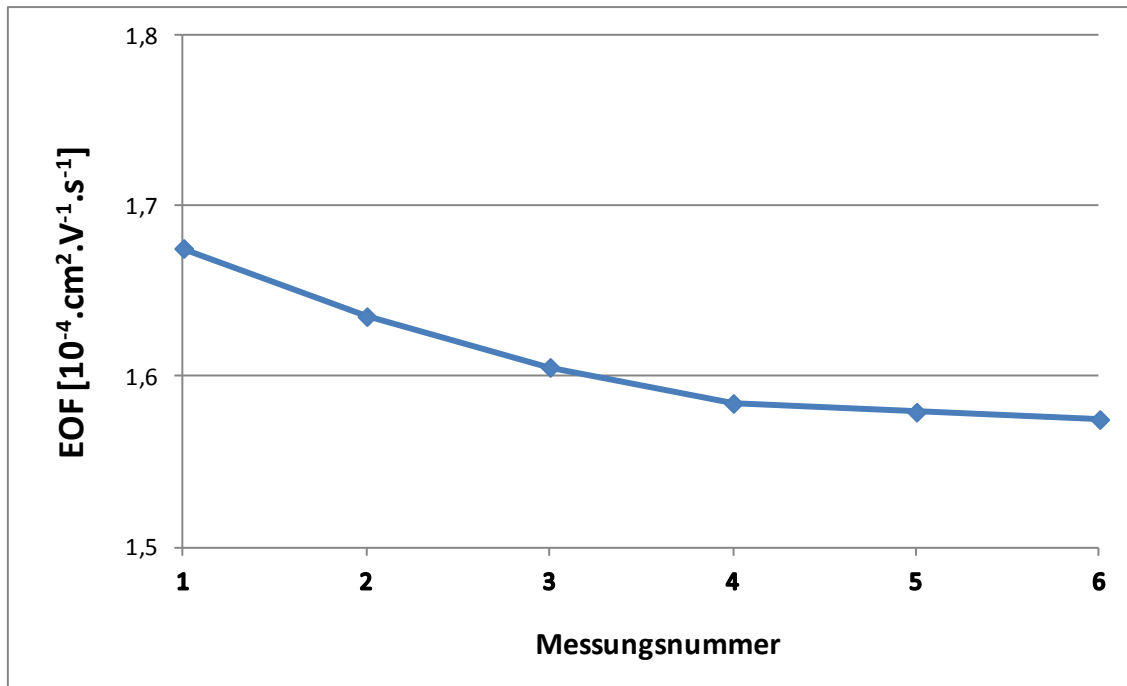
4-7 Mesityloxid-Peak erkennbar nach dem Zusatz von 20 mg/l Enoxaparin-Natrium als Ligand in 50 mM Acetat-Puffer pH 5,0. Ein typisches Muster zwischen ca. 4 und 6 Minuten ist erkennbar.

Das Verhalten vom EOF innerhalb von 6 aufeinanderfolgenden Messungen zeigt bei diesen Untersuchungen im Gegensatz zu den Untersuchungen mit

PPS keine signifikanten Änderungen. Sogar eine leichte Erhöhung der Migrationszeit des EOF-Markers konnte erkannt werden (siehe Abbildung 4-8). Die Erhöhung der Migrationszeit äußerte sich in einer leichten Abnahme der Mobilität der EOF-Markers, wie es in der Abbildung 4-9 zu erkennen ist. Dieses Phänomen könnte vermutlich darauf zurückzuführen sein, dass die Wechselwirkungen zwischen Enoxaparin-Natrium und Protamin nicht so stark ausgeprägt sind, wie es bei den Wechselwirkungen zwischen PPS und Protamin der Fall war.



4-8 Mesityloxid-Peak von 6 aufeinanderfolgenden Messungen nach Zusatz von 20 mg/l Enoxaparin-Natrium als Ligand in 50 mM Acetat-Puffer pH 5,0. Keine gleichmäßige Zunahme oder Abnahme von EOF ist zu erkennen.



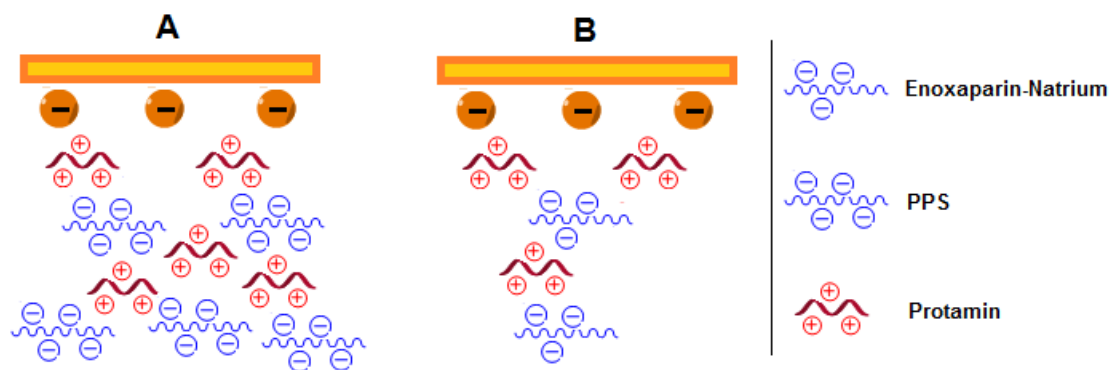
4-9 EOF-Marker-Mobilität nach Zusatz von 20 mg/l Enoxaprin-Natrium als Ligand in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0. Eine leichte Abnahme der elektrophoretischen Mobilität ist zu erkennen.

#### 4.4 Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen haben generell gezeigt, dass Affinitätskapillarelektrophorese eine geeignete Technik zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Heparinoiden und Proteinen ist. Die signifikanten Wechselwirkungen zwischen Protamin und den eingesetzten Heparinoiden PPS und Enoxaparin-Natrium konnten mit Hilfe von ACE detektiert und dargestellt werden. Außerdem haben vor allem die Untersuchungen, die mit PPS als Ligand durchgeführt wurden gezeigt, dass mit der Komplexbildung konkurrierende Adsorptionseffekte die Interpretation der ACE-Ergebnisse beeinflussen können und dementsprechend berücksichtigt werden müssen.

Die unterschiedlich ausgefallenen Ergebnisse der beiden eingesetzten Heparinoide könnten folgendermaßen und mit Hilfe der Abbildung 4-10 erklärt werden.

PPS und Enoxaparin-Natrium gehören zwar beide zur Gruppe der Heparinoide, dennoch gibt es Unterschiede im Aufbau der Monomere und der Ladungsdichte pro Monomer-Einheit. PPS hat beispielsweise mehr ionisierbare Gruppen pro Monomer-Einheit als Heparin und demzufolge eine höhere Ladungsdichte (siehe Abschnitt 2.3.2.4). Aus diesem Grund könnte PPS stärker in elektrostatische Wechselwirkung treten als Enoxaparin-Natrium (siehe Abbildung 4-10, A und B). Nach jeder Injektion von PPS in die Kapillare, lagern sich mehr PPS Moleküle an Protamin-Schichten und erhöhen somit den EOF (siehe Abbildung 4-10, A). Bei Enoxaparin-Natrium hingegen ist dieser Effekt vermutlich nicht so stark ausgeprägt, und demzufolge bleibt der EOF nach jeder Injektion von Enoxaparin-Natrium unverändert oder nimmt leicht ab (siehe Abbildung 4-10, B). Diese Interpretation der Ergebnisse bestätigt die Annahme, dass PPS stärker mit Protamin interagiert als Enoxaparin-Natrium.



4-10 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen den Heparinoiden und Protamin in der Kapillare. A: Unter Zusatz von PPS, B: Unter Zusatz von Enoxaparin-Natrium. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [33].

## **5 Untersuchung der Wechselwirkungen von Standardproteinen sowie Vitronectin mit Heparinoiden**

### **5.1 Einführung und Charakterisierung der untersuchten Proteine**

Nachdem sich die Heparinoide bei den Untersuchungen mit Protamin als geeignet für die kapillarelektrophoretische Untersuchungen erwiesen haben, wurden einzelne Affinitätsuntersuchungen mit den verschiedenen Proteinen durchgeführt. Dazu wurden fünf Standardproteine und ein zusätzliches Protein, Vitronectin, was u.a. in der Koagulationskaskade eine Rolle spielt, ausgewählt.

Die Standardproteine sind Proteine, die gut untersucht sind, relativ günstig in größeren Mengen zu erwerben sind, und zu den verschiedenen Forschungszwecken als Modellproteine genommen werden.

Ziel dieser Untersuchungen war auf der einer Seite, die schon bekannten Interaktionen von einigen Modellproteinen mit Heparin mittels der Affinitätskapillarelektrophorese zu bestätigen und mit den zusätzlich ausgewählten Heparinoiden, PPS und Enoxaprin-Natrium zu vergleichen. Auf der anderen Seite war es von großem Interesse, die Wechselwirkungen von bestimmten Proteinen, die in der Blutgerinnungskaskade vorkommen (z.B. Vitronectin) zu untersuchen. Aufbauend auf diesen Untersuchungen sollten die Wechselwirkungen von einem weiteren interessanten Protein, P-Selektin (siehe Abschnitt 8) mit den Heparinoiden geklärt werden. In den Abschnitten 5.1.1 – 5.1.6 sind alle untersuchten Proteine kurz vorgestellt. Alle Untersuchungen wurden mit der gleichen affinitätskapillarelektrophoretischen Methode (siehe Abschnitt 11.3.3) durchgeführt.

#### **5.1.1 $\beta$ -Lactoglobulin**

$\beta$ -Lactoglobulin ist das häufigste in der Kuhmilch vorkommende Protein. Es gehört zu der Lipocalin-Familie mit der Eigenschaft, verschiedene hydrophobe Moleküle zu binden.  $\beta$ -Lactoglobulin wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht, da es einerseits eine große Rolle in der Milchindustrie spielt, und andererseits ein relativ robustes Protein darstellt, das als ein Standardprotein

zur Überprüfung bestimmter biochemischer und physikalischer Techniken genutzt wird.  $\beta$ -Lactoglobulin besteht aus 162 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 18,4 kDa [38–40].

### 5.1.2 Rinderserumalbumin (BSA)

Rinderserumalbumin (BSA) ist ein Serumalbuminprotein, das aus dem Blutplasma von Rindern gewonnen wird und eine strukturelle Homologie von ca. 76 % mit dem humanen Serumalbumin besitzt [41]. Aufgrund der geringen Kosten, leichter Verfügbarkeit, hoher Stabilität, guter Wasserlöslichkeit und struktureller Ähnlichkeit mit HSA, wird BSA weithin als ein Modellprotein zur Bewertung der Bindung und Interaktionen zwischen Arzneimitteln und Serumalbumin eingesetzt [41,42]. BSA besteht aus einer Polypeptidkette mit 583 Aminosäuren, 17 Cysteinresten und drei homologen Domänen (I, II und III) [41,43]. Das Molekulargewicht von BSA beträgt 66 kDa [44]. Außerdem neigt natives BSA dazu, SS-stabilisierte Isomere zu bilden [45]. Diese Isomerisierung ist ein dynamischer Prozess, bei der es durch SH-SS-Austauschreaktionen zu einer Neuknüpfung von Disulfidbrücken und damit zu Konformationsänderungen und Änderungen des isoelektrischen Punktes kommt [45].

### 5.1.3 Humanserumalbumin (HSA)

Humanes Serumalbumin (HSA) ist das am häufigsten im Blutplasma vorkommende Protein und stellt zwei Drittel der Plasmaproteine dar [46]. HSA dient als Depot- und Transportprotein für zahlreiche endogene und exogene Verbindungen, wie Fettsäuren, Aminosäuren, Steroide, aber auch einige Metallionen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  [47]. HSA wird in der Leber synthetisiert und besteht aus 585 Aminosäuren in einer einzigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 66,5 kDa [48–50]. HSA besteht aus drei Domänen (I, II und III), die strukturell sehr ähnlich sind und durch 17 Disulfidbrücken stabilisiert werden. Jede Domäne enthält zwei Subdomänen A und B [46,51–53]. Dockal et al. haben beschrieben, dass HSA je nach pH-Wert unterschiedliche Tertiärstrukturen einnimmt [54].

Es ist bekannt, dass HSA bestimmte Arzneimittel binden kann, wodurch die Konformation des HSA-Moleküls modifiziert werden kann [55,56]. Amphiphile



Arzneimittel und einige endogene Substanzen binden reversibel und mit hoher Affinität an Serumalbumin. Durch die Bindung an Serumalbumin wird die Konzentration von ungebundenen Arzneimitteln im Plasma verringert, und infolgedessen die Verteilung, Pharmakokinetik, Toxizität und die Ausscheidung von den Arzneimitteln beeinflusst. Aus diesem Grund stellt HSA einen wichtigen Regulator des pharmakokinetischen Verhaltens vieler Medikamente dar [46]. Die Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen HSA und Arzneistoffen tragen dazu bei, die Disposition, den Transport, den Stoffwechsel und die Wirksamkeit der Medikamente besser verstehen und beurteilen zu können.

#### **5.1.4 Myoglobin**

Myoglobin ist ein globuläres Protein, das in den Herz- und Skelettmuskelzellen von Säugetieren vorkommt. Wie Hämoglobin kann auch Myoglobin den molekularen Sauerstoff binden und ihn an die Muskelzellen wieder abgeben. Myoglobin ist ein Monomer und bindet den Sauerstoff im Gegensatz zu Hämoglobin nicht kooperativ. Außerdem enthält Myoglobin ein Häm-gebundenes Eisen (II)-Kation, das zum Eisen (III)-Kation oxidiert werden kann. Myoglobin kann sehr leicht und in großen Mengen aus dem Muskelgewebe extrahiert werden und dient als ein wichtiges Modellsystem zur Untersuchung der physikalischen und dynamischen Eigenschaften von Reaktionen in den Proteinen. Myoglobin besteht aus 153 Aminosäuren und sein Molekulargewicht beträgt ca. 17 kDa [57–60].

#### **5.1.5 Ovalbumin**

Ovalbumin ist das Hauptprotein im Eiweiß und stellt 54 % aller im Eiweiß vorkommenden Proteine dar. Ovalbumin ist aufgrund der leichten Verfügbarkeit und den funktionellen Eigenschaften, wie Schäumen, Gelieren und Emulgieren in der Lebensmittelindustrie weit verbreitet und findet als Standardprotein auch in Proteinstudien häufige Verwendung. Ovalbumin besteht aus 385 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Es ist bekannt, dass Ovalbumin mit vielen Verbindungen, u. a. Antioxidantien interagieren kann. Dadurch wird eine Konformationsänderung in Ovalbumin verursacht, die zu einer Minimierung der Aktivität von Ovalbumin führt, und das Allergiepotential von Ovalbumin herabsetzt [61–64].

### **5.1.6 Vitronectin**

Vitronectin ist ein Glykoprotein und gehört zur Gruppe der strukturell und funktionell homologen adhäsiven Proteine, die in der Prokoagulationsphase des hämostatischen Systems eine wesentliche Rolle bezüglich der Interaktionen von den Thrombozyten und ihrem Anhaften an der Gefäßwand spielen. Außerdem besitzt dieses Protein auch zusätzliche funktionelle Domänen, die zu seiner multifunktionalen Rolle u.a. als Regulator im Immunsystem als auch bei der Fibrinolyse beitragen. Strukturell besteht Vitronectin aus 459 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 75 kDa. Vitronectin besteht aus drei Domänen, die N-terminale Somatomedin-B-Domäne, die zentrale Domäne mit einer Hämpexin-Homologie und eine C-terminale Domäne, die ebenfalls eine Hämpexin-Homologie aufweist. Die Somatomedin-B-Domäne bindet an Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und stabilisiert ihn. Außerdem interagiert diese Domäne mit dem Urokinase-Rezeptor und reguliert somit die Zellmigration und -adhäsion. Ein hoher Plasmaspiegel von PAI-1 und Urokinase-Rezeptor werden beispielsweise bei den Patienten mit bestimmten Krebserkrankungen gefunden. Darüber hinaus ist Vitronectin ein Bestandteil von Thrombozyten, und ist damit an der Hämostase beteiligt [65–69].

Weiterhin wurde berichtet, dass Vitronectin die Fähigkeit besitzt, Heparin und Kollagen zu binden [67,69,70]. Aufgrund seiner heparinbindenden Eigenschaften hat dieses Protein Auswirkungen auf die Entstehung von Thrombose [67,69].

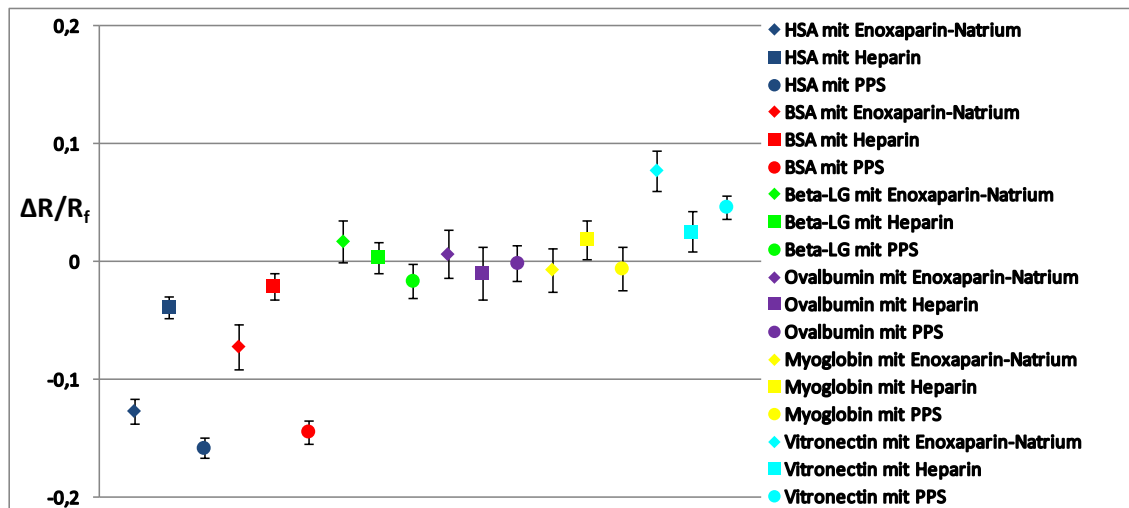
## **5.2 Eingesetzte Heparinoide**

Die Experimente wurden mit drei Heparinoiden, Heparin (siehe Abschnitt 2.3.2.1), Enoxaparin-Natrium (siehe Abschnitt 2.3.2.2) und Natrium-Pentosanpolysulfat (PPS) (siehe Abschnitt 2.3.2.4), in der Konzentration von jeweils 20 mg/l durchgeführt. Zur Auswertung der Affinitätsstärken wurden jeweils  $\Delta R/R_f$ -Werte (siehe Abschnitt 2.2.4) berechnet und ausgewertet.

## **5.3 Ergebnisse**

Die Ergebnisse der Wechselwirkungen zwischen den eingesetzten Proteinen und den Heparinoiden sind in der Abbildung 5-1 dargestellt.

## Untersuchung der Wechselwirkungen von Standardproteinen sowie Vitronectin mit Heparinoiden



5-1 Interaktionsdiagramm von den 6 untersuchten Proteinen mit Enoxaparin-Natrium, Heparin und PPS.

Wie aus der Abbildung 5-1 eindeutig hervorgeht, treten von den 6 untersuchten Proteinen, nur 3 Proteine, HSA, BSA und Vitronectin in signifikante Wechselwirkungen mit den Heparinoiden. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme und entsprach Literaturangaben, bei denen Interaktionen von diesen Proteinen mit Heparin untersucht wurden [70–72].

Im Gegensatz dazu erkennt man keine signifikanten Wechselwirkungen von Beta-LG, Myoglobin und Ovalbumin mit den Heparinoiden, was ebenfalls eine Bestätigung von Literaturangaben darstellt. In der Literatur wurde von einer pH-abhängigen Komplexbildung von Metmyoglobin mit Heparin berichtet, die durch Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie, sowie Differential-Scanning-Mikrokalorimetrie festgestellt wurde, jedoch konnten keine Bindungsaffinitäten berichtet werden [73]. Im Falle von Ovalbumin konnten bei massenspektrometrischen Untersuchungen ebenfalls keine Affinitäten zu Heparin ermittelt werden [74].

Darüber hinaus ist zu erkennen, dass HSA und BSA stärkere Wechselwirkungen mit PPS zeigen als mit Enoxaparin-Natrium und Heparin. Ein interessantes Phänomen wurde außerdem bei den Wechselwirkungen von HSA mit den Heparinoiden beobachtet, und zwar wurde nach der Interaktion mit den Heparinoiden ein Splitting des HSA-Peaks beobachtet. Dieses Phänomen wurde daraufhin näher untersucht und ist im Abschnitt 6 genauer beschrieben.

Betrachtet man die Wechselwirkungen von Heparin im Vergleich zum niedermolekularen Heparin, Enoxaparin-Natrium, erkennt man, dass Heparin in den meisten Fällen eine etwas schwächere Interaktion als Enoxaparin-Natrium zeigt.

Vitronectin zeigt im Allgemeinen signifikante Wechselwirkungen mit den Heparinoiden. Der interessante Punkt bei den Untersuchungen von Vitronectin war, dass der  $\Delta R/R_f$ -Wert im positiven Bereich erschienen ist. Dieser positive  $\Delta R/R_f$ -Wert bedeutet kürzere Migrationszeiten von Vitronectin nach der Interaktion mit den Heparinoiden. Dieses interessante Phänomen könnte aufgrund einer Konformationsänderung von Vitronectin nach der Wechselwirkung mit den Heparinoiden zustande gekommen sein [75], die zu einer positiven Nettooberflächenladung und damit zu einer kürzeren Migrationszeit führt. Es ist bekannt, dass eine Veränderung der Konformation von Vitronectin und seine Multimerisierung zu einer Veränderung der Heparinbindung an Vitronectin führen [70].

#### **5.4 Zusammenfassung**

Die durchgeführten Experimente mit den 5 Standardproteinen und Vitronectin haben eindeutig gezeigt, dass Speicher- und Transportproteine im Blutplasma, sowie die in der Koagulationskaskade vorkommenden Proteine, eine stärkere Wechselwirkung mit den Heparinoiden zeigen als andere Proteine. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion mit den Heparinoiden die Konformation von manchen Proteinen verändern kann. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass verschiedene Heparinoide trotz ihres ähnlichen chemischen Aufbaus unterschiedlich stark mit den Proteinen interagieren.

## **6 Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden**

### **6.1 Versuchsaufbau und untersuchte Heparinoide**

Aufgrund der großen Bedeutung von Serumalbuminen in der Arzneimittelforschung wurden separate Untersuchungen mit den beiden Serumalbuminen BSA (siehe Abschnitt 5.1.2) und HSA (siehe Abschnitt 5.1.3) mit den drei ausgewählten Heparinoiden, Heparin (siehe Abschnitt 2.3.2.1), PPS (siehe Abschnitt 2.3.2.4) und Enoxaparin-Natrium (siehe Abschnitt 2.3.2.2) durchgeführt. Außerdem war von großem Interesse herauszufinden, wie sich die Aufspaltung des HSA-Peaks, die bei den im Abschnitt 5 beschriebenen Untersuchungen beobachtet wurde, in Abhängigkeit von der eingesetzten Heparinoidkonzentration verhält. Beachtenswert war dabei die Frage, ob es sich um eine zufällige Veränderung der Peakform von HSA gehandelt hat, oder ob diese Beobachtung ein generelles Phänomen darstellt. Von allen eingesetzten Heparinoiden wurde eine Konzentrationsreihe von 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 500 mg/l und 1000 mg/l für die Interaktionsuntersuchungen hergestellt. Um den Einfluss der Messtemperatur auf die Aufspaltungsmuster zu erfassen, wurden alle Untersuchungen bis auf Enoxaparin-Natrium bei zwei ausgewählten Temperaturen, 23 °C und 37 °C durchgeführt. Die Interaktionsuntersuchungen von den Heparinoiden mit Enoxaparin-Natrium konnten aufgrund eines Geräteausfalls nur bei 23 °C durchgeführt werden.

Die eingesetzte Affinitätskapillarelektrophoretische Methode, sowie die Trenn- und Spülbedingungen sind im Abschnitt 11.3.3 ausführlich beschrieben.

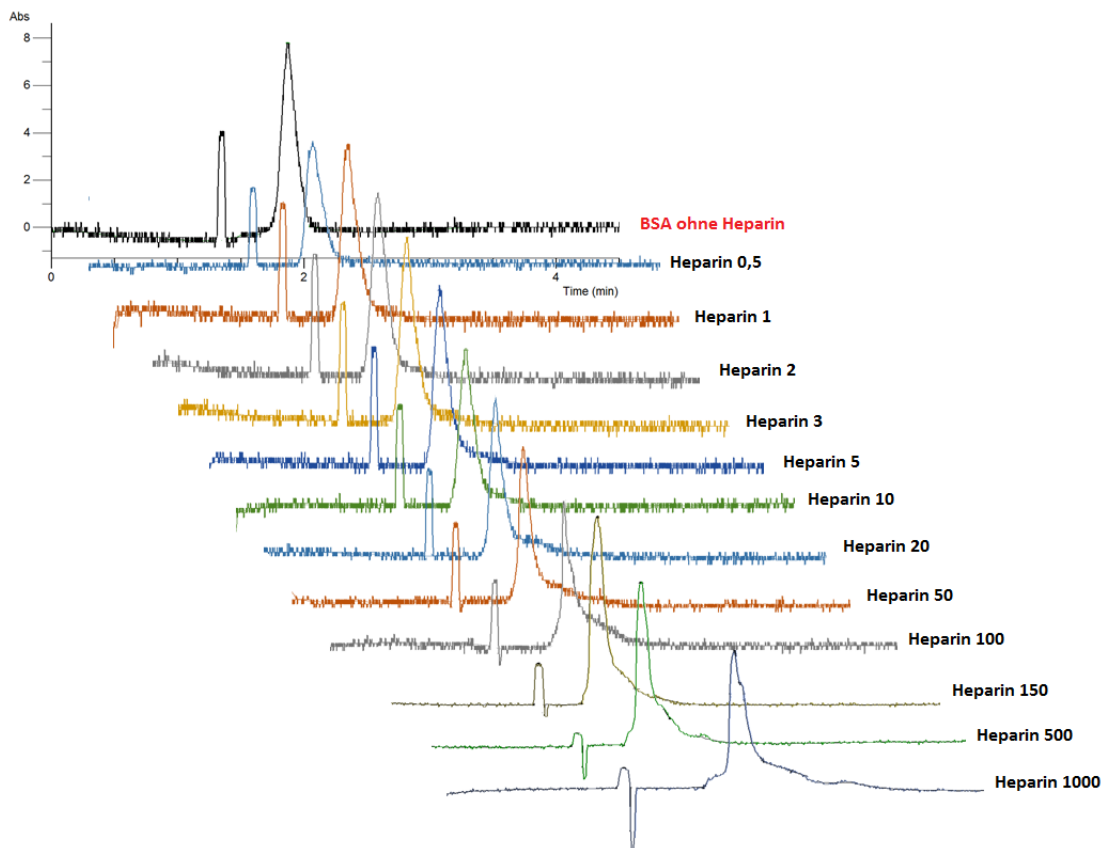
### **6.2 Ergebnisse**

#### **6.2.1 Wechselwirkungen von BSA mit Heparin**

In den Abbildungen 6-1 und 6-2 sind jeweils die BSA-Peaks ohne Zusatz von Heparin, und nach dem Zusatz von Heparin in aufsteigender Konzentration bei 23 °C und 37 °C dargestellt. Bei den Messungen, die bei 23 °C durchgeführt wurden, erkennt man, dass von der Konzentration 0,5 mg/l bis zu der

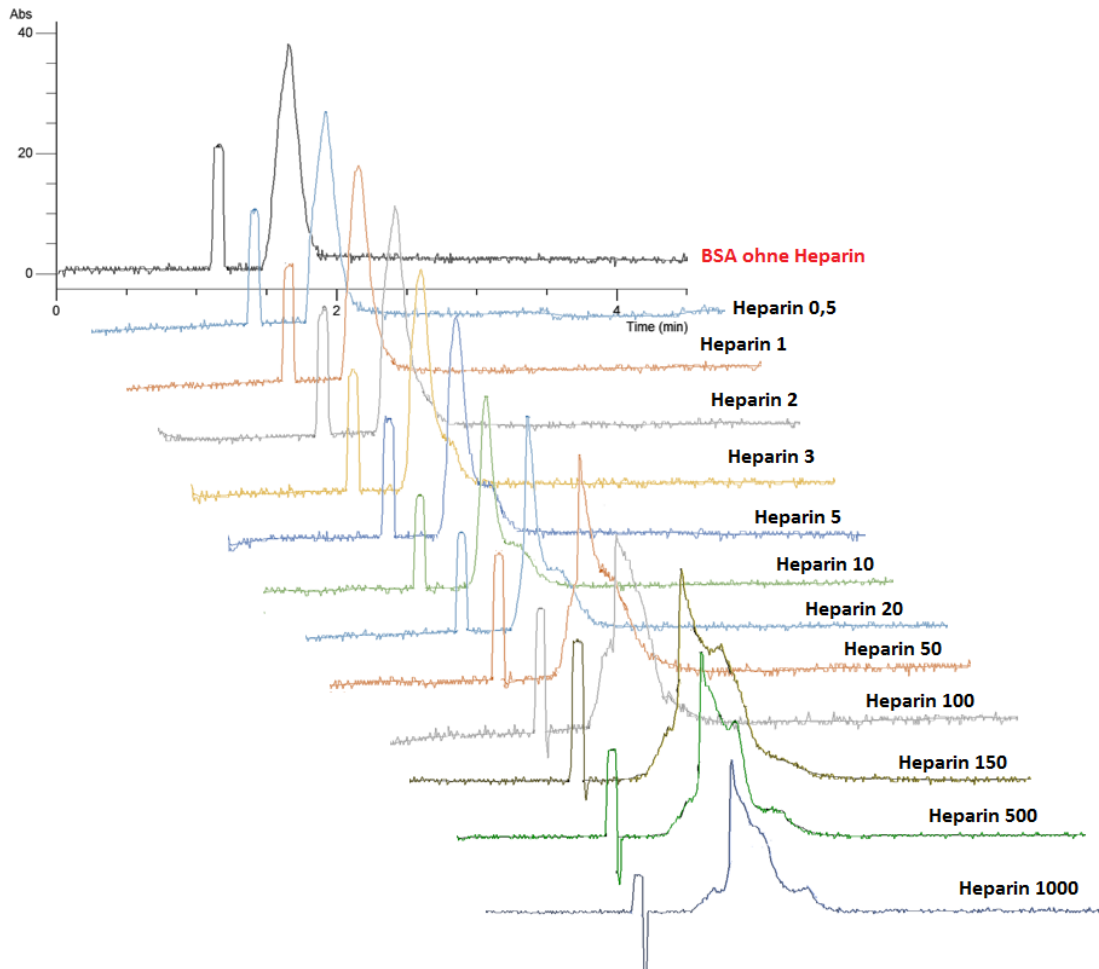
## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden

Konzentration 500 mg/l keine große Veränderung der Peakform vorhanden ist, lediglich bei der Konzentration von 1000 mg/l kann man eine kleine Veränderung an der Spitze des Peaks erkennen (siehe Abbildung 6-1). Erhöht man die Temperatur auf 37 °C, beobachtet man einen Einfluss auf die Peakform bei den höheren Konzentrationen im Bereich von 100 mg/l bis 1000 mg/l. Die Peaks werden unsymmetrisch, und es ist die Ausbildung einer Schulter zu erkennen (siehe Abbildung 6-2).



6-1 BSA-Peaks ohne Heparin und nach dem Zusatz von Heparin in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 23 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. BSA dar.

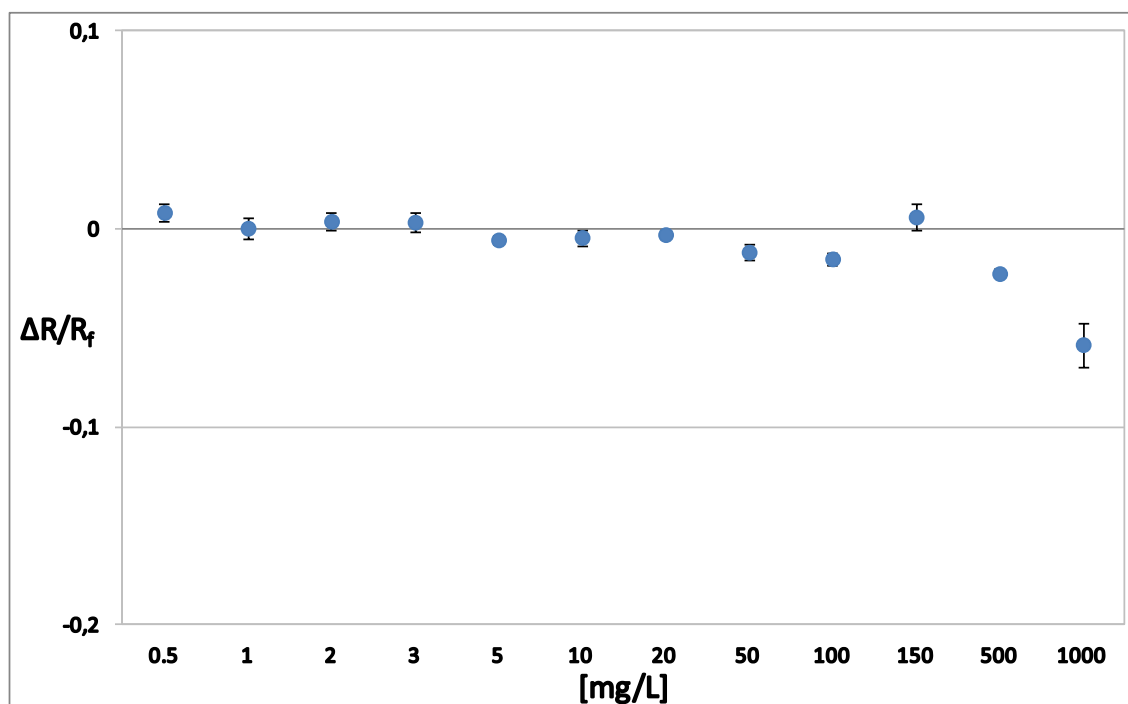
## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden



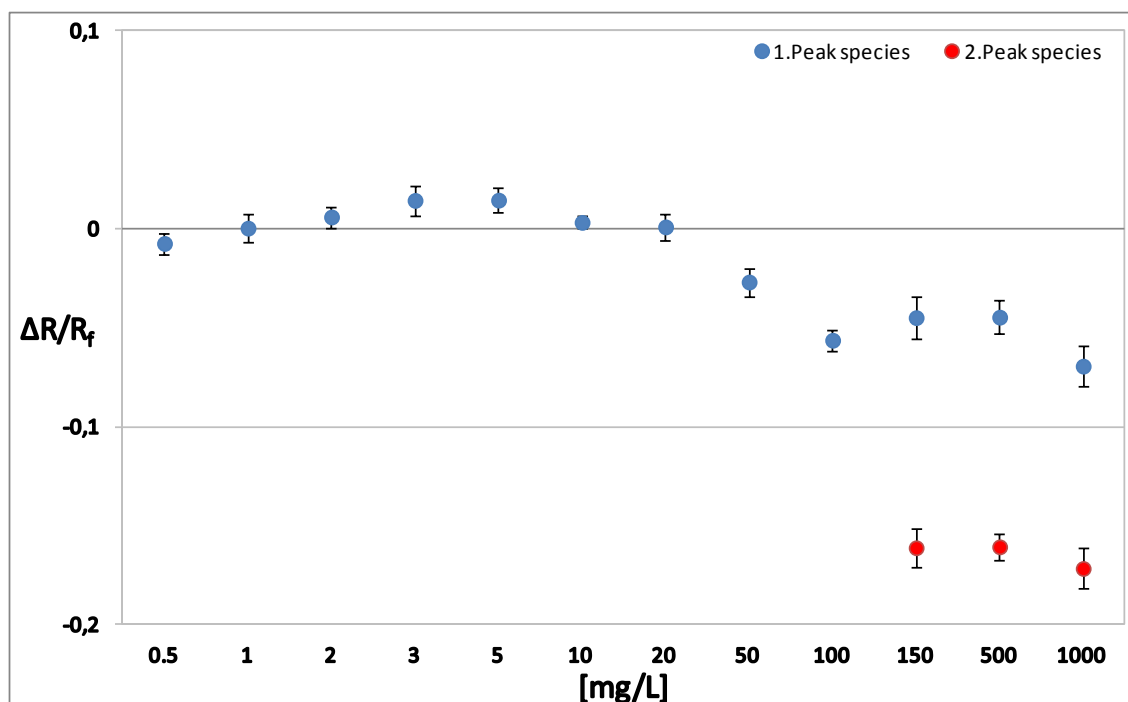
6-2 BSA-Peaks ohne Heparin und nach dem Zusatz von Heparin in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 37 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. BSA dar.

Die Interaktionsdiagramme sind in den Abbildungen 6-3 und 6-4 dargestellt. Dabei kann man eindeutig erkennen, dass die Erhöhung der Temperatur nicht nur einen Einfluss auf die Peakform, sondern auch die Stärke der Interaktionen hatte. Während die Messungen, die bei 23 °C durchgeführt wurden, keine signifikanten Interaktionen bei Heparinkonzentrationen von 0,5 mg/l bis 500 mg/l zeigten (siehe Abbildung 6-3), beobachtete man bei den Messungen, die bei 37 °C durchgeführt wurden, schon ab einer Heparinkonzentration von ca. 50 mg/l eine signifikante Interaktion (siehe Abbildung 6-4). Da bei den 37 °C-Messungen eine Veränderung der Peakform zu erkennen war, die ab der Heparinkonzentration von ca. 150 mg/l auf das Vorliegen von zwei Spezies hindeutete, wurde bei den Berechnungen der Interaktionen die zweite Spezies auch mit berücksichtigt (siehe Abbildung 6-4).

# Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden



6-3 Interaktionsdiagramm von BSA mit Heparin bei 23 °C.

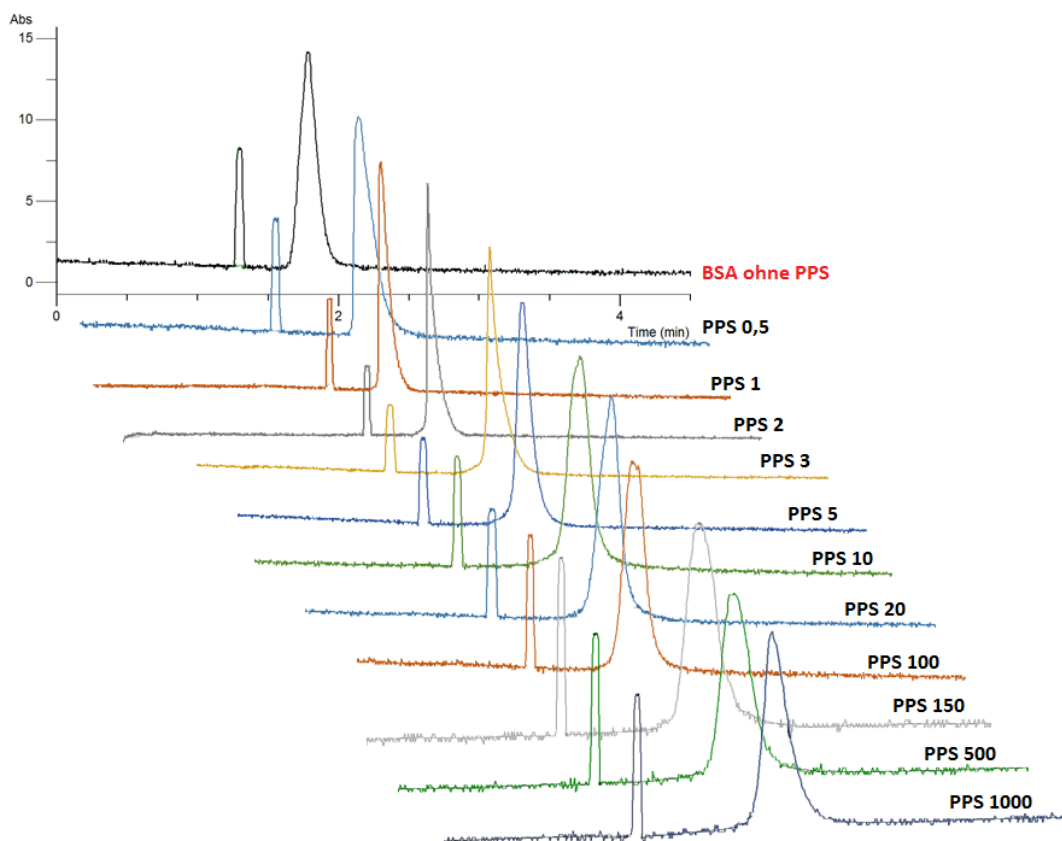


6-4 Interaktionsdiagramm von BSA mit Heparin bei 37 °C.

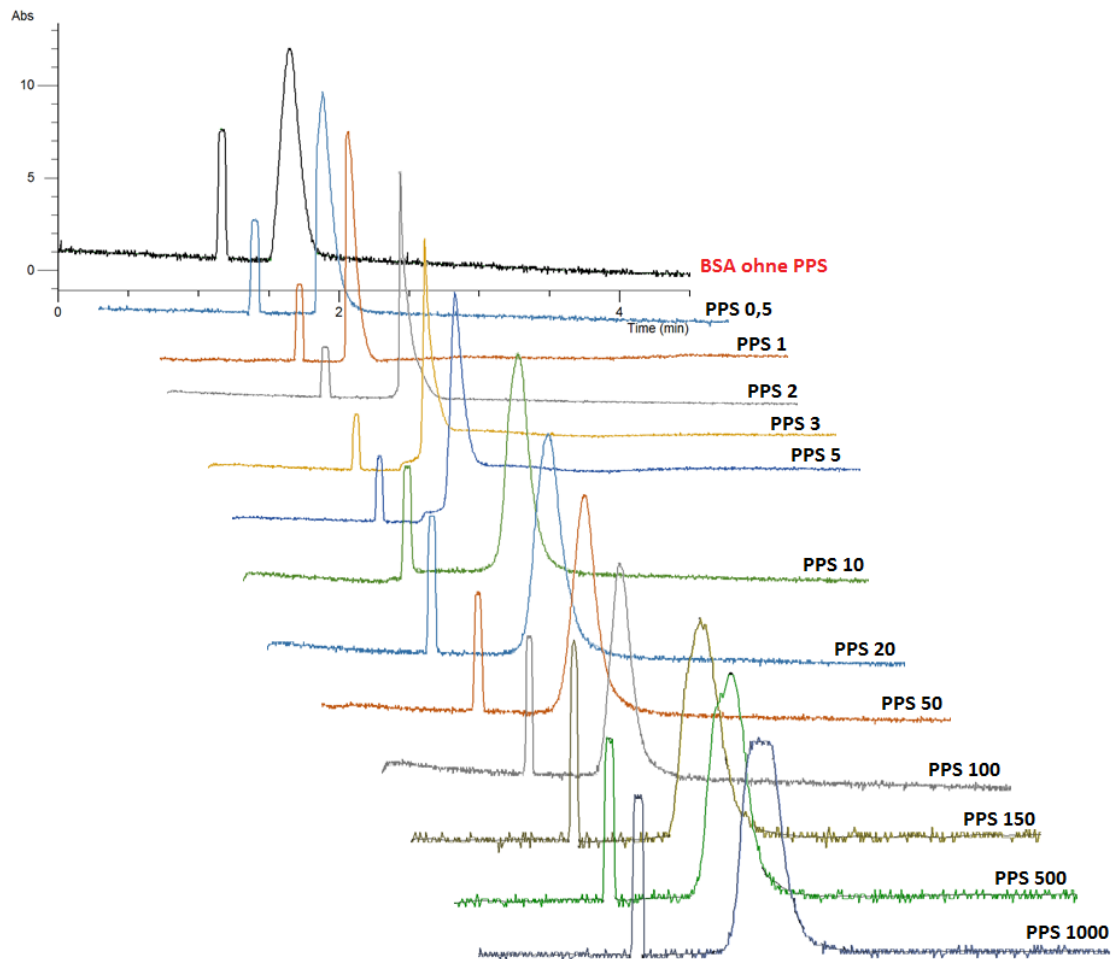


### 6.2.2 Wechselwirkungen von BSA mit PPS

Wie man anhand der Abbildungen 6-5 und 6-6 eindeutig erkennen kann, hatte der Zusatz von PPS keinen großen Einfluss auf die Peakform von BSA. Bei den Messungen, die bei 23 °C durchgeführt wurde, hat sich die Spitze der BSA-Peak von der PPS-Konzentration von 0,5 mg/l bis zu der höchsten Konzentration, 1000 mg/l kaum verändert, man konnte lediglich eine kleine Peak-Verbreiterung erkennen (siehe Abbildung 6-5). Das gleiche gilt auch für die 37 °C-Messungen. Auch bei diesen Messungen wurden die Peaks etwas breiter, aber sie wurden nicht aufgespalten. Die Spitze des BSA-Peaks wurde nach dem Zusatz von PPS in der höchsten Konzentration (1000 mg/l) flacher (siehe Abbildung 6-6).



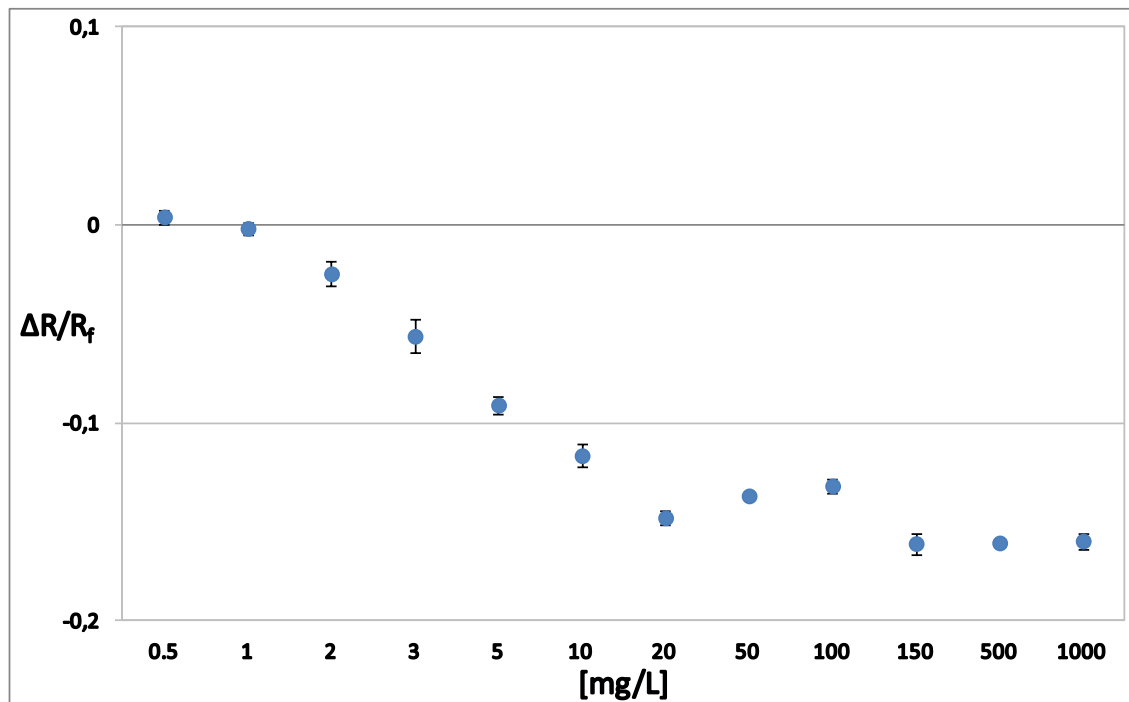
6-5 BSA-Peaks ohne PPS und nach dem Zusatz von PPS in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 23 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. BSA dar.



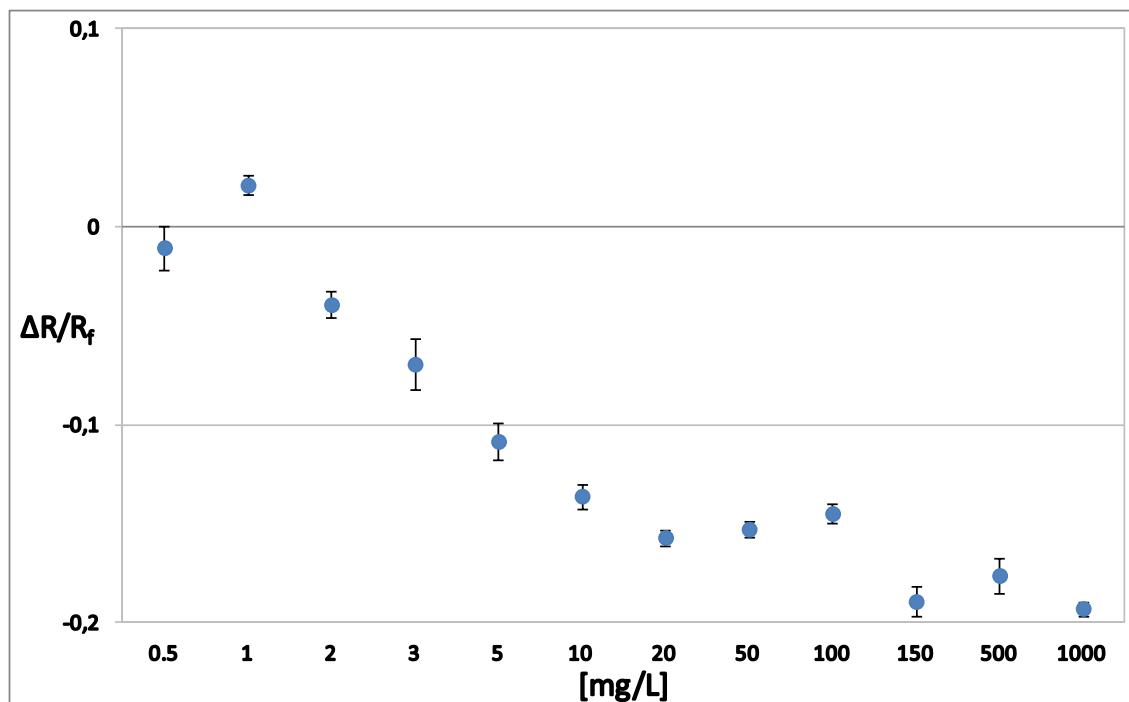
6-6 BSA-Peaks ohne PPS und nach dem Zusatz von PPS in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 37 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. BSA dar.

Die Interaktionsdiagramme von den beiden Messungen verliefen etwa parallel (siehe Abbildungen 6-7 und 6-8). Sowohl bei den Messungen, die bei 23 °C durchgeführt wurden, als auch bei den 37 °C-Messungen erkennt man eine Vergrößerung der Interaktionsstärke zwischen BSA und PPS mit der Erhöhung der PPS-Konzentration (von 0,5 mg/l bis 20 mg/l). Diese Untersuchungen haben einerseits gezeigt, dass PPS im Gegensatz zu Heparin mit BSA interagiert, wobei die Stärke dieser Interaktion von der Konzentration der zugesetzten PPS abhängt. Auf der anderen Seite sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Messserien bei 23 °C und 37 °C im Hinblick auf die Peakform und die Stärke der Interaktionen zu erkennen.

## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden



6-7 Interaktionsdiagramm von BSA mit PPS bei 23 °C.

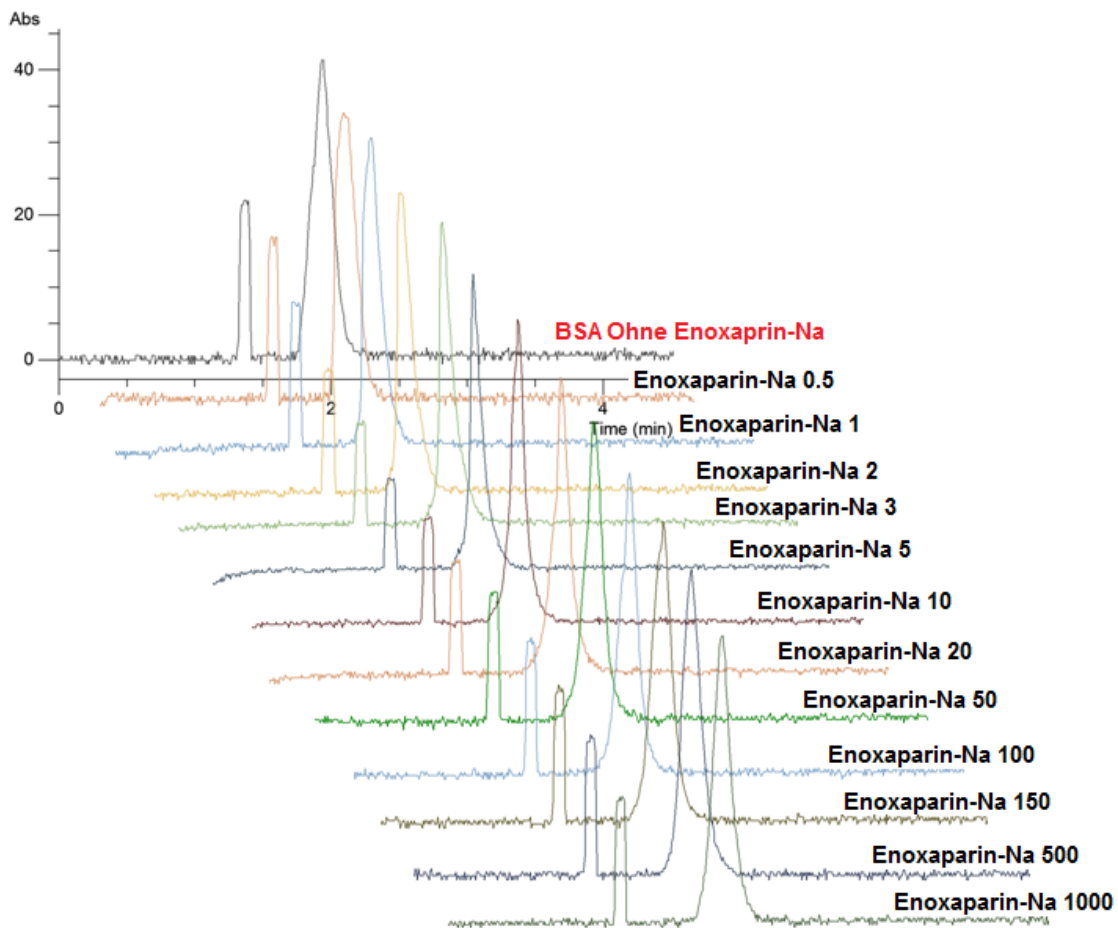


6-8 Interaktionsdiagramm von BSA mit PPS bei 37 °C.

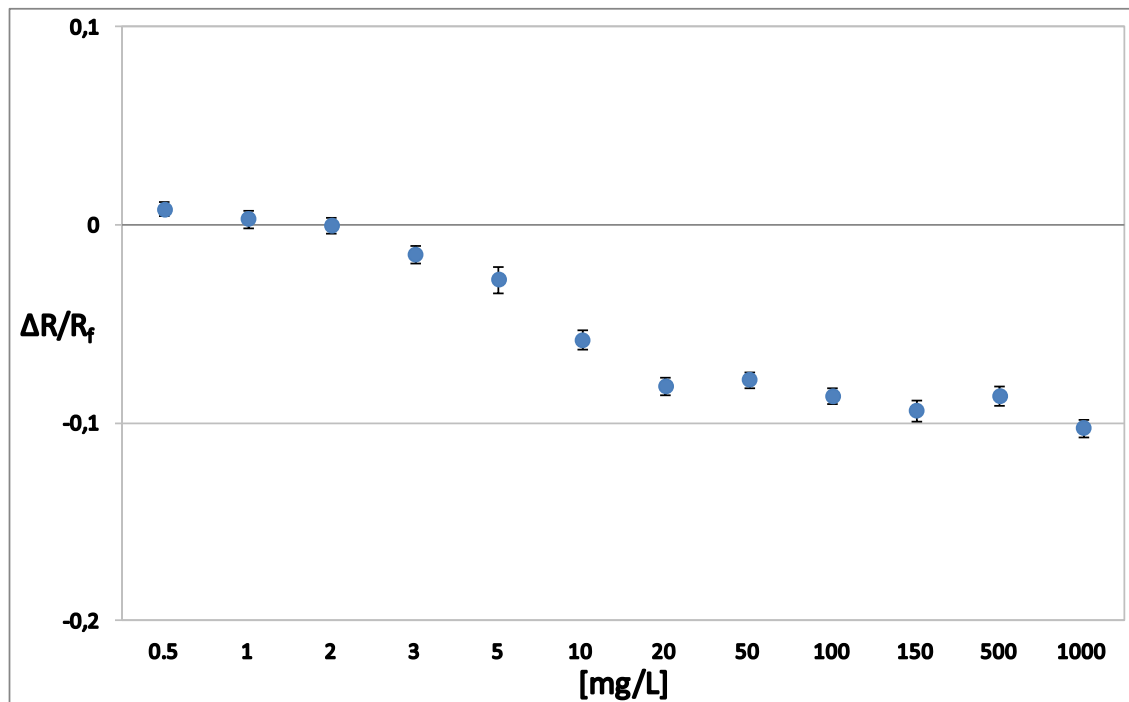
### 6.2.3 Wechselwirkungen von BSA mit Enoxaprin-Natrium

Diese Untersuchungen wurden, wie bereits erwähnt, nur bei 23 °C durchgeführt. Die Abbildung 6-9 stellt die BSA-Peaks vor- und nach der

Interaktion mit Enoxaparin-Natrium dar, wobei keine Veränderung der Peakform beobachtet werden kann. Das Interaktionsdiagramm von BSA mit Enoxaparin-Natrium ist der Abbildung 6-10 zu entnehmen. Erkennbar ist auch bei diesem Diagramm, dass ähnlich wie bei PPS, ab einer Konzentration von 20 mg/l keine Zunahme der signifikanten Wechselwirkungen zwischen BSA und Enoxaparin-Natrium zu verzeichnen ist. Die Interaktionen sind dabei insgesamt etwas schwächer als die zwischen BSA und PPS.



6-9 BSA-Peaks ohne Enoxaparin-Natrium und nach dem Zusatz von Enoxaparin-Natrium in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 23 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. BSA dar.



6-10 Interaktionsdiagramm von BSA mit Enoxaparin-Natrium bei 23 °C.

#### 6.2.4 Wechselwirkungen von HSA mit Heparin

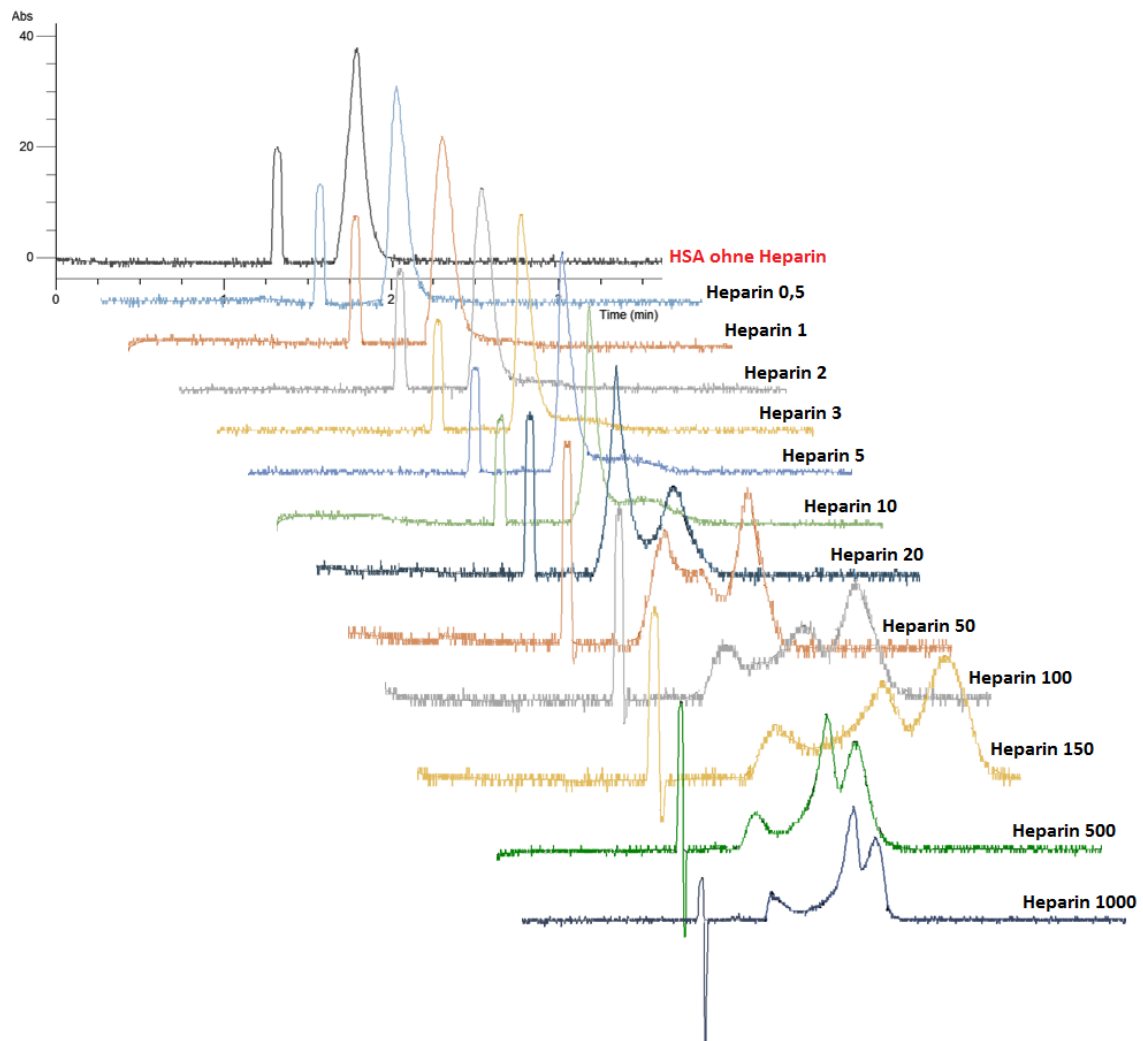
HSA zeigte generell das interessante Phänomen, dass nach der Interaktion mit den Heparinoiden der HSA-Peak deutlich in zwei oder mehr Peaks aufgespalten wird, also neue Peaks und damit neue HSA-Spezies entstehen.

Nach der Interaktion von HSA mit Heparin bei 23 °C konnte man eine deutliche Veränderung der Peakform schon ab einer Heparinkonzentration von 10 mg/l erkennen. Diese Veränderung entwickelte sich ab einer Heparinkonzentration von 20 mg/l in Form einer Aufspaltung in 2 Peaks. Ab einer Heparinkonzentration von 50 mg/l konnte man sogar eine 3-fache Aufspaltung bzw. das Erscheinen von 3 Peaks beobachten (siehe Abbildung 6-11).

Ein ähnliches Aufspaltungsmuster war bei den Messungen, die bei 37 °C durchgeführt wurden, zu erkennen. In diesem Fall war eine Veränderung der Peakform schon ab einer Heparinkonzentration von 10 mg/l erkennbar. Ab einer Heparinkonzentration von 20 mg/l bis zu der Heparinkonzentration von 100 mg/l konnte man eine 2-fache, und ab einer Heparinkonzentration von 150 mg/l eine 3-fache Aufspaltung, bzw. das Auftauchen von 3 Peaks erkennen (siehe Abbildung 6-12).

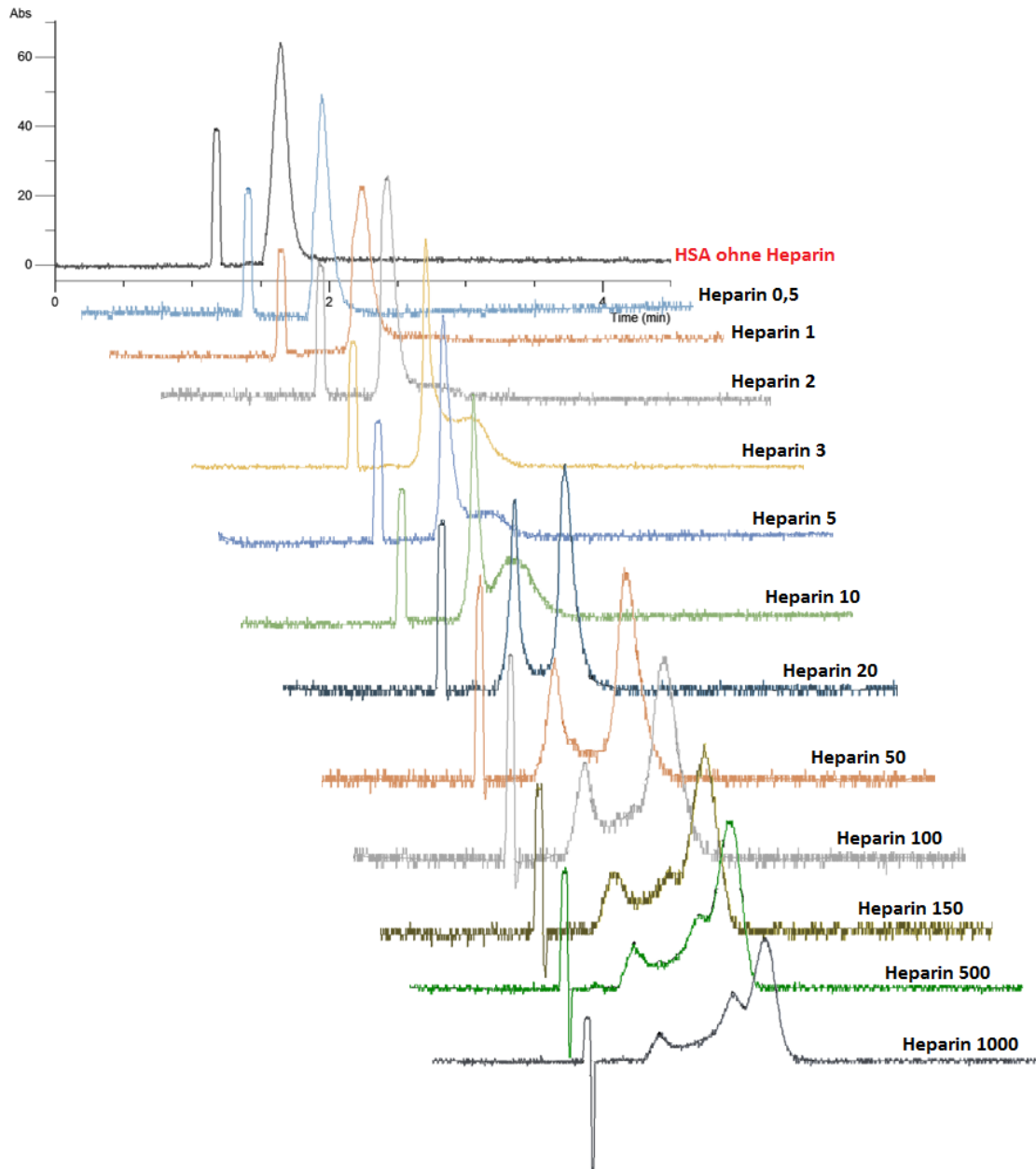
## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden

---



6-11 HSA-Peaks ohne Heparin und nach dem Zusatz von Heparin in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 23 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. HSA dar.

## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden

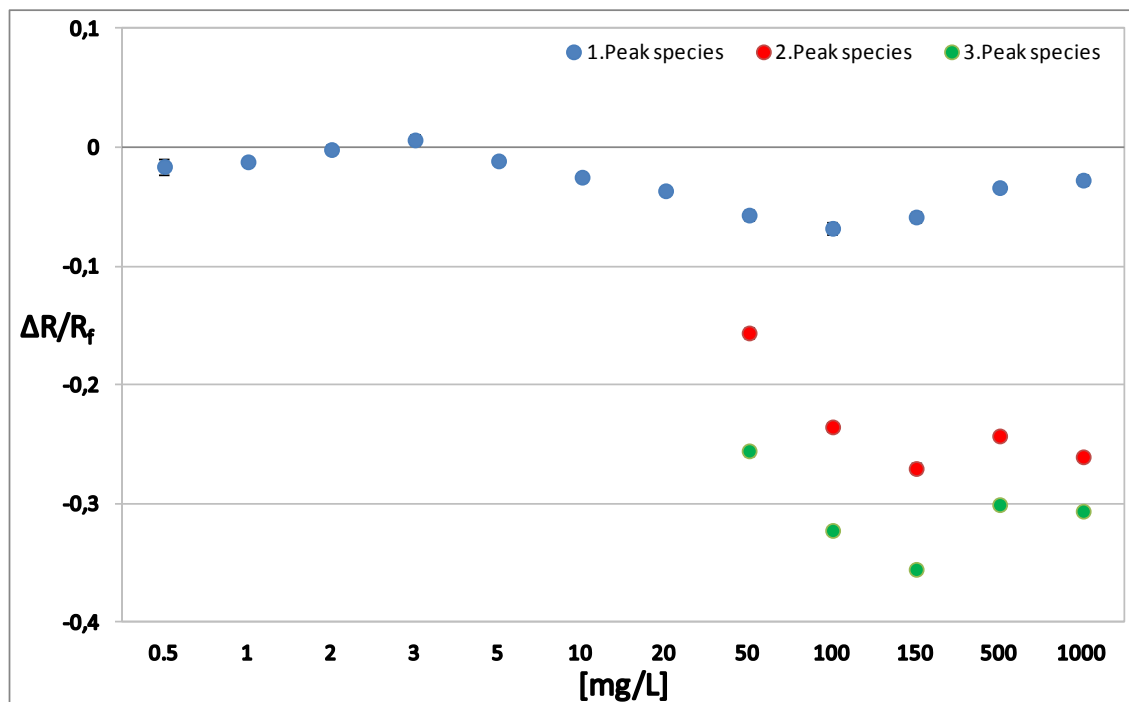


6-12 HSA-Peaks ohne Heparin und nach dem Zusatz von Heparin in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 37 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. HSA dar.

Die Interaktionsdiagramme von HSA mit Heparin bei 23 °C und 37 °C sind in den Abbildungen 6-13 und 6-14 dargestellt. Betrachtet man den ersten Peak von HSA (blaue Punkte in den Diagrammen), erkennt man sowohl bei den 23 °C-Messungen als auch bei den 37 °C-Messungen, dass von der Heparinkonzentration von 0,5 mg/l bis zu der Heparinkonzentration von 10 mg/l keine signifikanten Wechselwirkungen mit HSA vorhanden sind. Erst ab der Heparinkonzentration von 10 mg/l bis zu der Heparinkonzentration von 100 mg/l ist eine Steigerung der Interaktionsstärke mit der Zunahme der Konzentration

erkennbar. Die Stärke der Interaktionen bezogen auf den ersten Peak nimmt aber ab einer Heparinkonzentration von 150 mg/l wieder ab. Die Interaktionen bezogen auf die zweite (rote Punkte) und die dritte (grüne Punkte) Peak-Spezies zeigen ein ähnliches Verhalten sind aber insgesamt stärker als die der ersten Spezies.

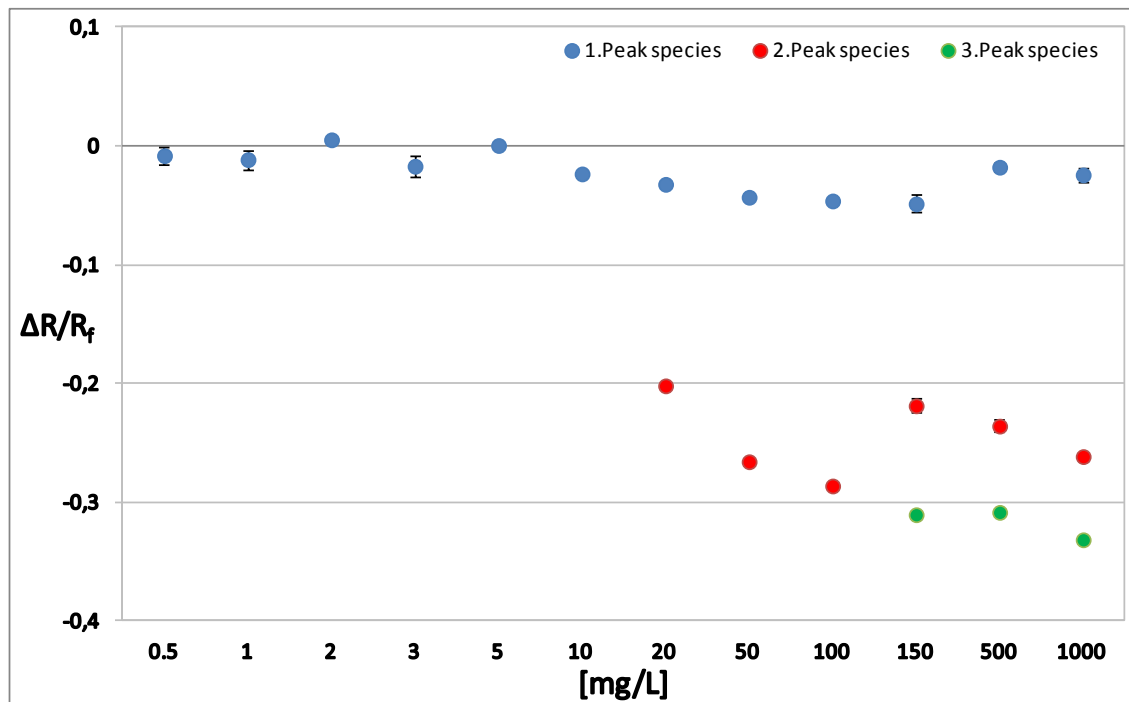
Die Unterschiede zwischen den Messserien bei den zwei verschiedenen Temperaturen bestehen darin, dass bei den 23 °C-Messungen die dritte messtechnisch erfassbare Peak-Spezies schon ab einer Heparinkonzentration von 50 mg/l zu beobachten ist (siehe Abbildungen 6-11 und 6-13), während bei den 37 °C-Messungen dieser Peak erst später, und zwar ab der Heparinkonzentration von 150 mg/l auftritt (siehe Abbildungen 6-12 und 6-14).



6-13 Interaktionsdiagramm von HSA mit Heparin bei 23 °C.



## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden

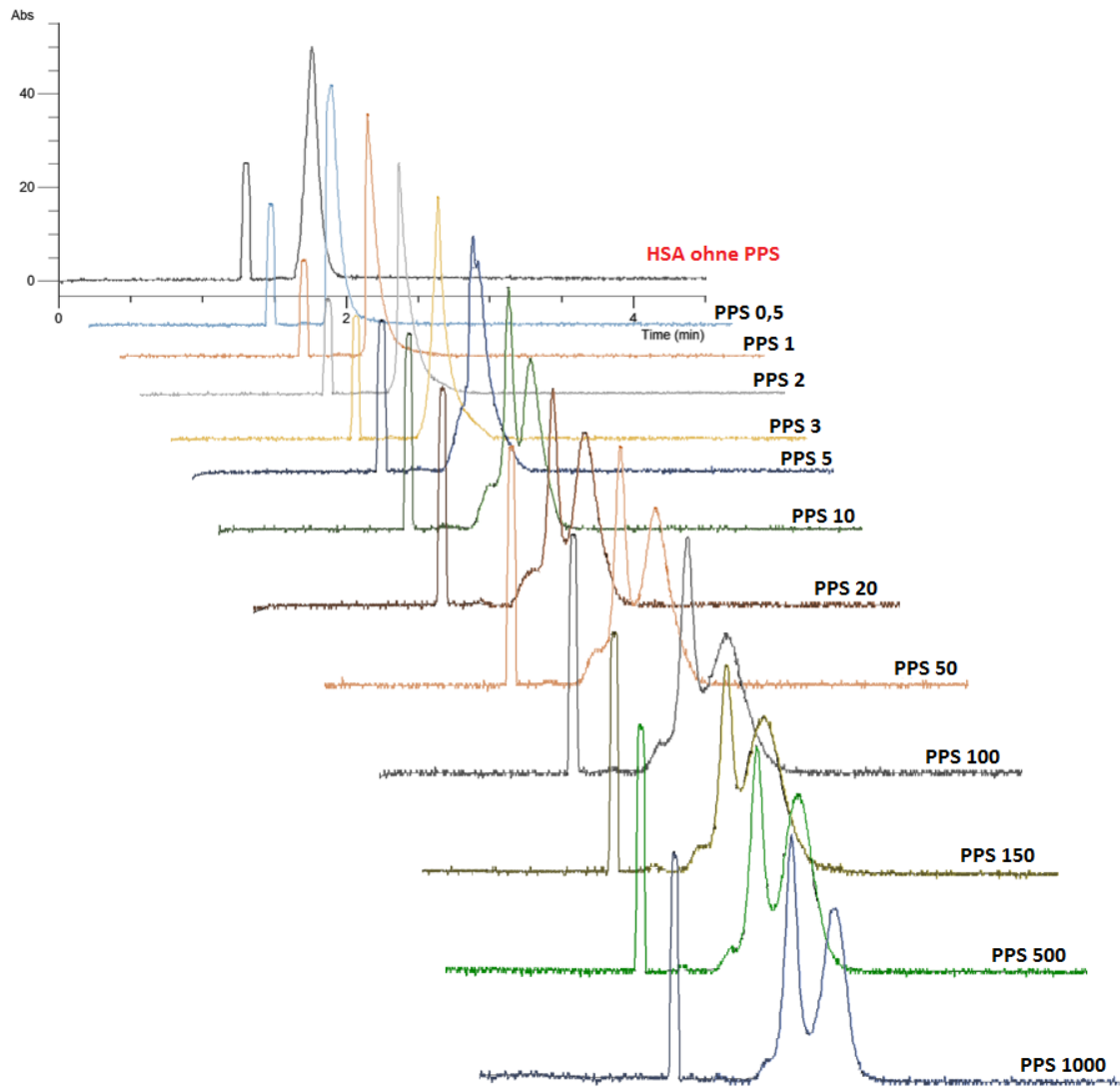


6-14 Interaktionsdiagramm von HSA mit Heparin bei 37 °C.

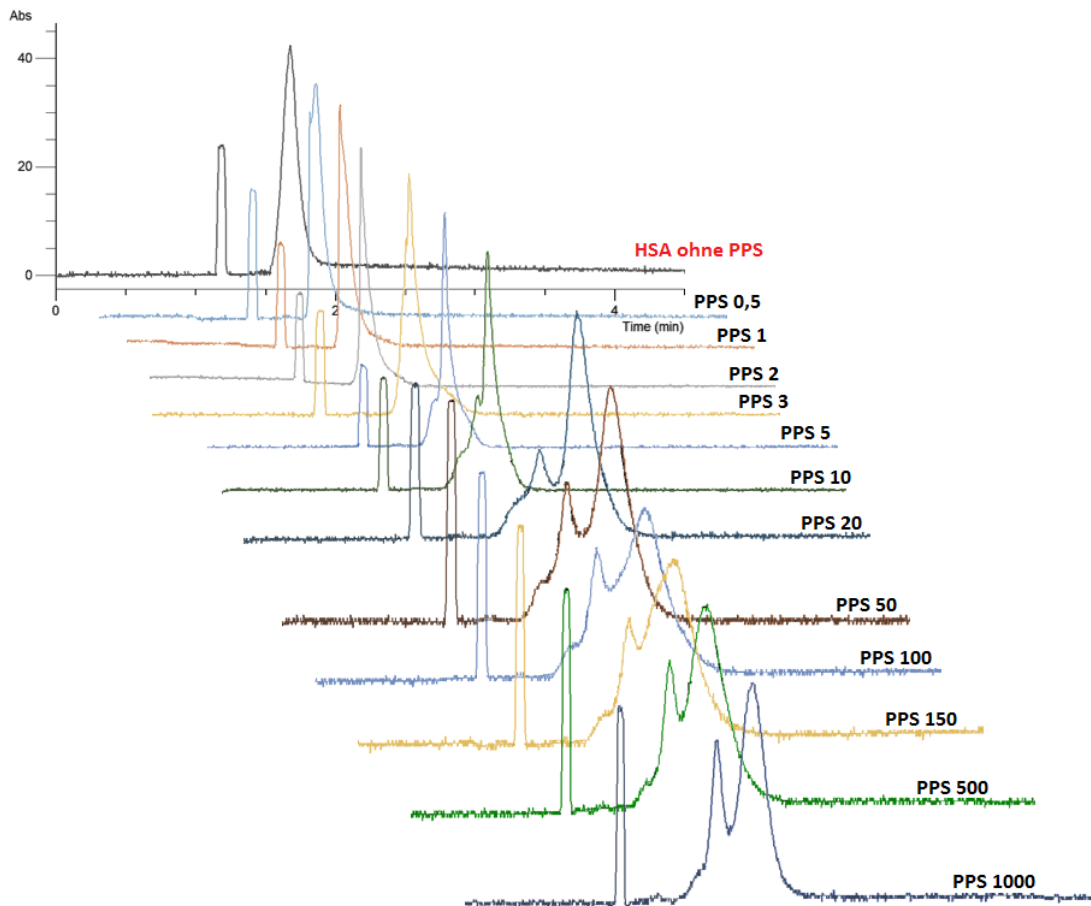
### 6.2.5 Wechselwirkungen von HSA mit PPS

Die Wechselwirkungen zwischen HSA und PPS führten dazu, dass sich die HSA-Peaks in nur 2 Spezies aufgespalten haben. Sowohl bei den Messungen, die bei 23 °C durchgeführt wurden, als auch bei den 37 °C-Messungen kann man schon ab einer PPS-Konzentration von 5 mg/l eine kleine Aufspaltung erkennen (siehe Abbildungen 6-15 und 6-16). Je höher die PPS-Konzentration war, umso besser wurden die Peaks aufgelöst, sodass bei den höheren Konzentrationen zwei separierte, allerdings nicht basisliniengetrennte Peaks erkennbar waren. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Temperatur-Messserien bestand darin, dass bei den 23 °C-Messungen die erste Peak-Spezies größer als die zweite Peak-Spezies war (siehe Abbildung 6-15), während dies bei den 37 °C-Messungen umgekehrt war (siehe Abbildung 6-16).

## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden



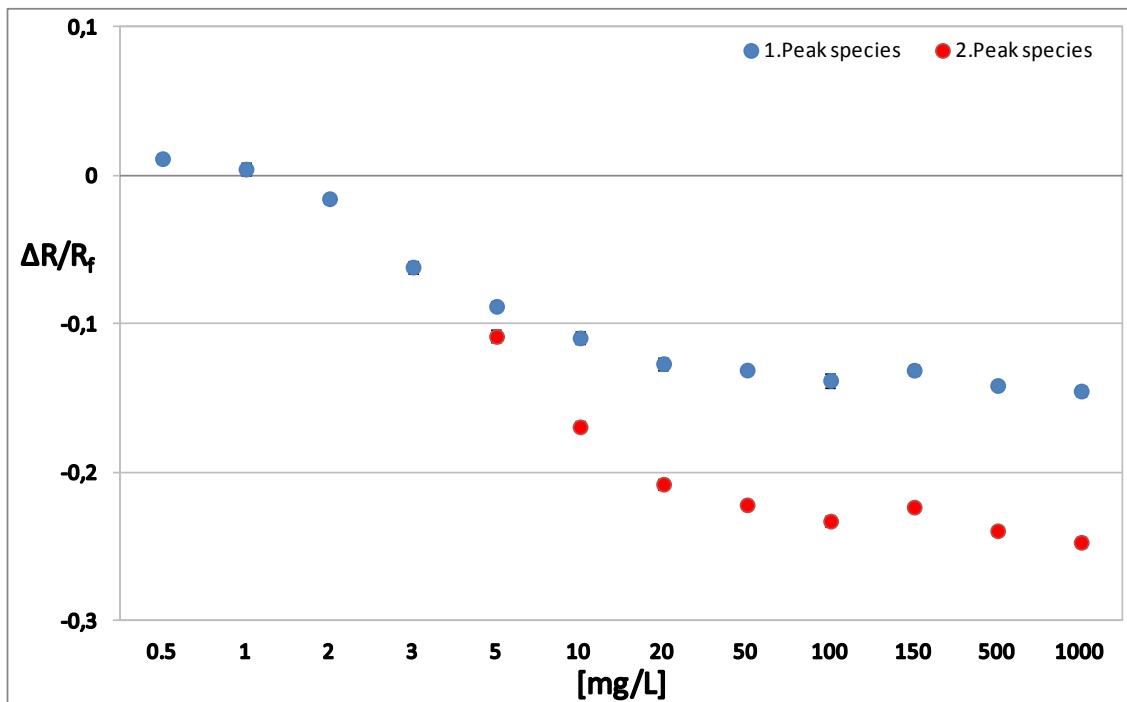
6-15 HSA-Peaks ohne PPS und nach dem Zusatz von PPS in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 23 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. HSA dar.



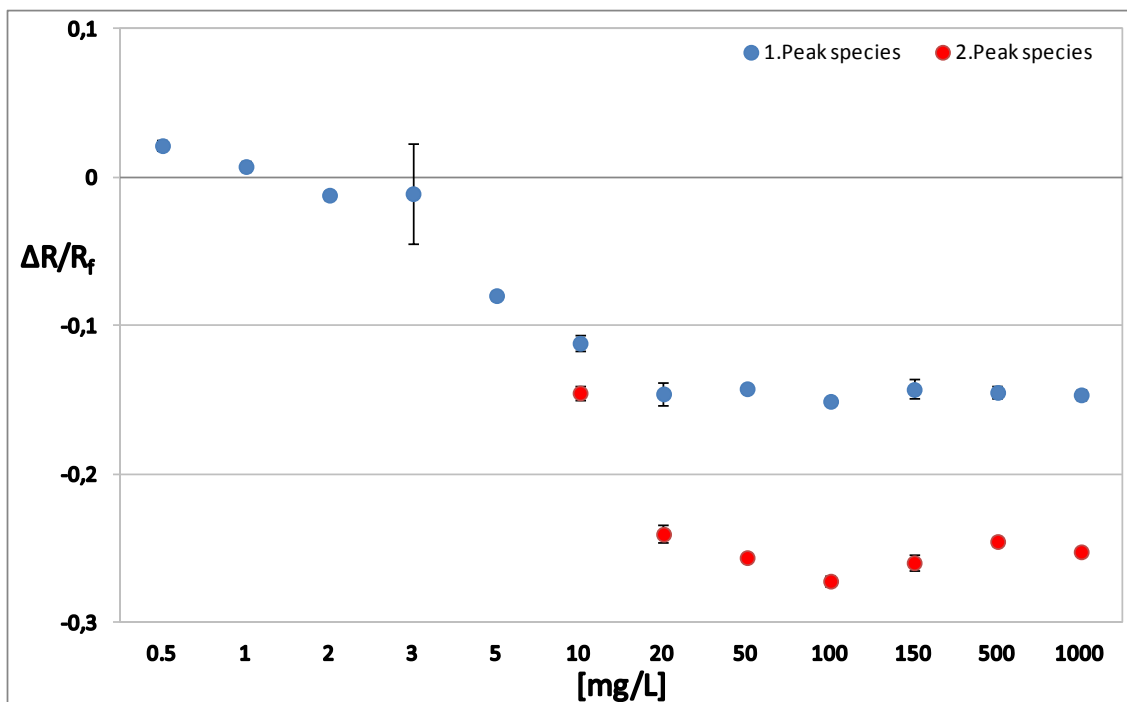
6-16 HSA-Peaks ohne PPS und nach dem Zusatz von PPS in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 37 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. HSA dar.

Die Interaktionsdiagramme von HSA und PPS sind den Abbildungen 6-17 und 6-18 zu entnehmen. Man kann in erster Linie eine gewisse Parallelität zwischen den beiden Temperatur-Messserien beobachten. Eindeutig zu erkennen ist außerdem eine steigende Interaktionsstärke mit der Erhöhung der PPS-Konzentration von ca. 3 mg/l bis etwa 20 mg/l. Ab der PPS-Konzentration von 20 mg/l sind die Interaktionen relativ konstant geblieben, d. h. die Erhöhung der PPS-Konzentration führte zu keinen stärkeren Interaktionen. Diese Beobachtung gilt ebenfalls für die beiden Messserien. Weiterhin hervorzuheben ist, dass sich der Abstand zwischen den beiden Peak-Spezies (blaue und rote Punkte in den Interaktionsdiagrammen) ebenfalls von der PPS-Konzentration von 5 mg/l bzw. 10 mg/l bis zu der PPS-Konzentration von 20 mg/l vergrößert hat. Danach ist dieser Abstand konstant geblieben (siehe Abbildungen 6-17 und 6-18).

## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden



6-17 Interaktionsdiagramm von HSA mit PPS bei 23 °C.

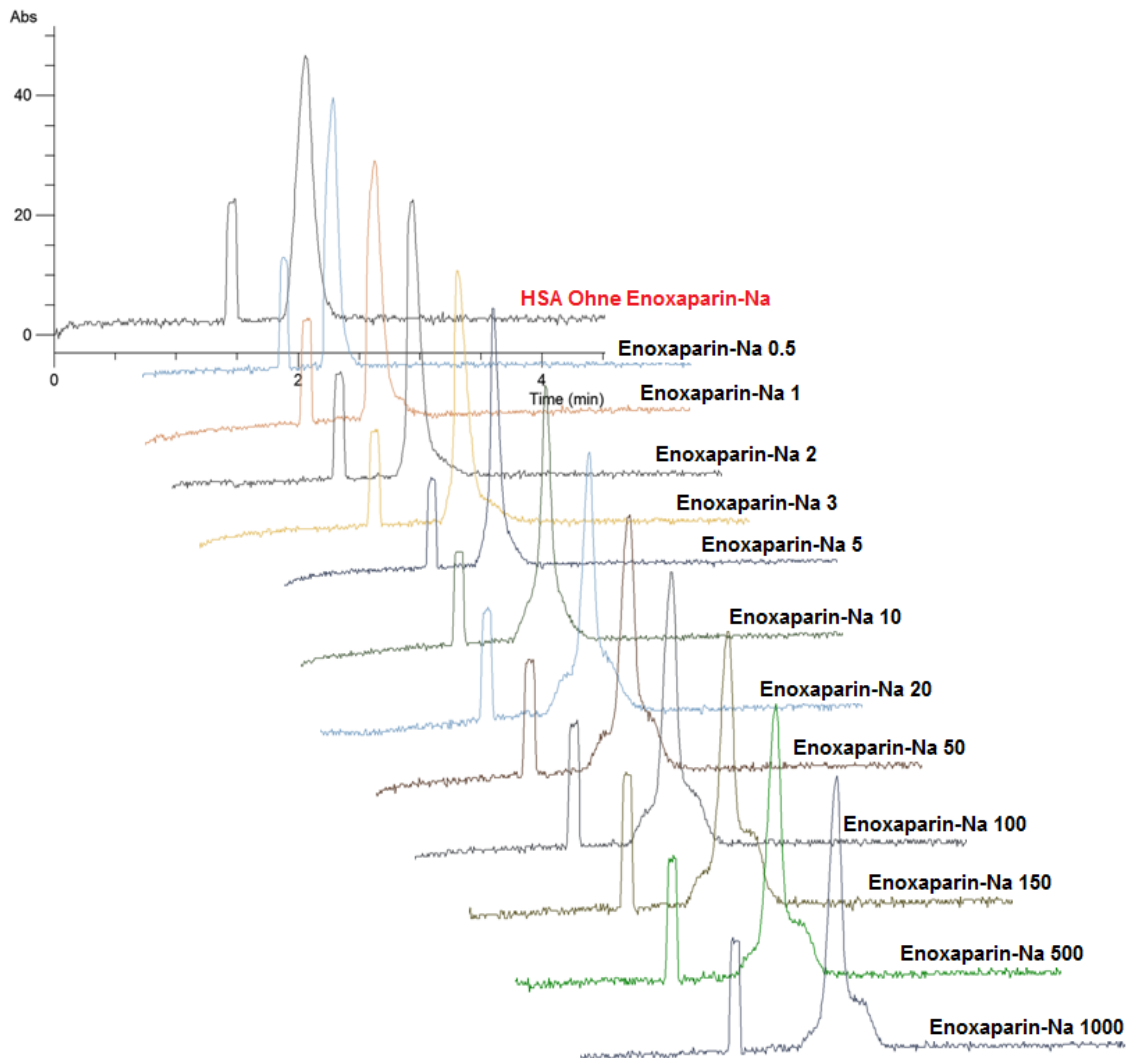


6-18 Interaktionsdiagramm von HSA mit PPS bei 37 °C.

### 6.2.6 Wechselwirkungen von HSA mit Enoxaparin-Natrium

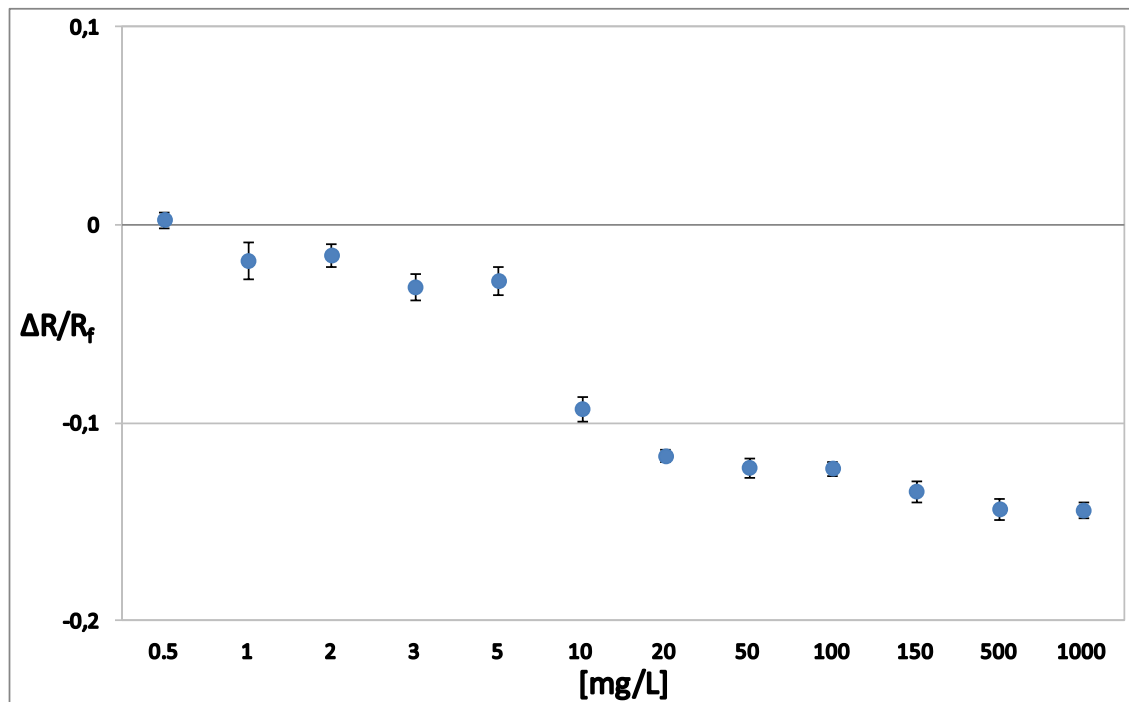
Ähnlich wie bei den BSA-Messungen wurden auch diese Messungen nur bei 23 °C durchgeführt. Beachtenswert bei diesen Messungen war, dass sich die Peakform von HSA nach dem Zusatz von Enoxaparin-Natrium, im Gegensatz

zu Heparin und PPS, kaum verändert hat. Lediglich eine plateauähnliche Erhebung ist auf der rechten Seite der Peaks zu erkennen, aber man kann kein Splitting der Peaks beobachten (siehe Abbildung 6-19).



6-19 HSA-Peaks ohne Enoxaparin-Natrium und nach dem Zusatz von Enoxaparin-Natrium in zwölf verschiedenen Konzentrationen, in Tris-Puffer 20 mM bei 23 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den EOF-Marker bzw. HSA dar.

Die Interaktionen zwischen HSA und Enoxaparin-Natrium sind in der Abbildung 6-20 dargestellt. Signifikante Wechselwirkungen sind ab einer Enoxaparin-Konzentration von 10 mg/l erkennbar. Ab dieser Konzentration ist der Verlauf der Interaktionsstärke mit den Interaktionen zwischen HSA und PPS vergleichbar.

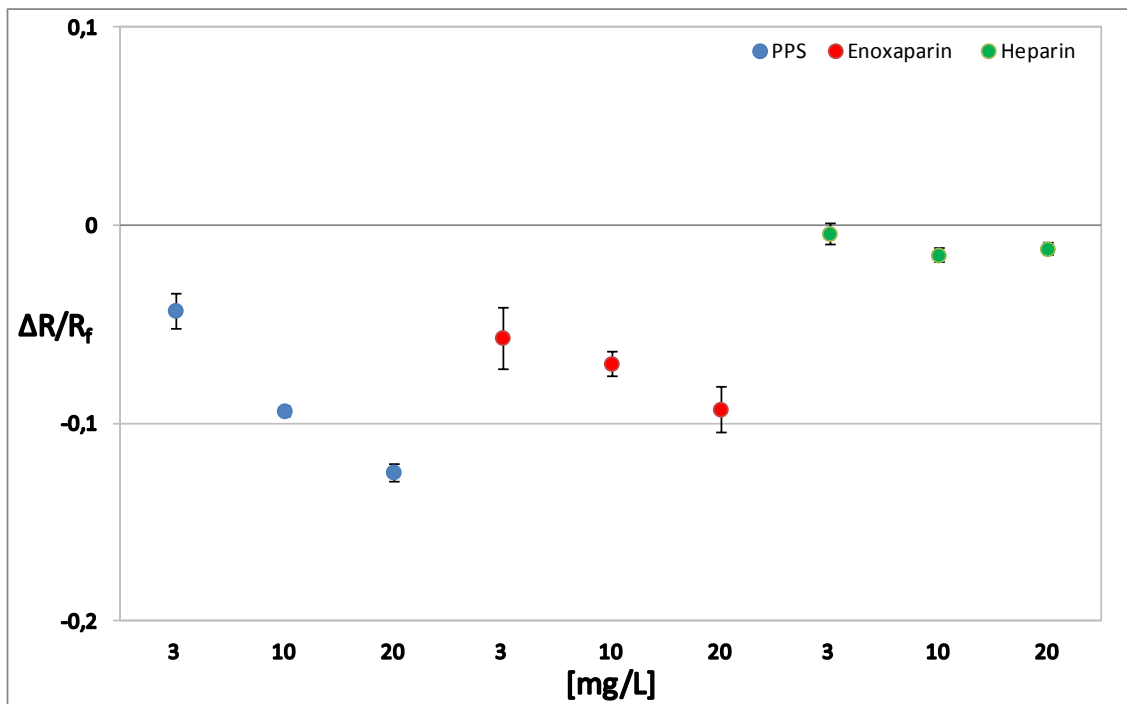


6-20 Interaktionsdiagramm von HSA mit Enoxaparin-Natrium bei 23 °C.

#### 6.2.7 Zusätzliche Interaktionsuntersuchungen von anderen Chargen von BSA, HSA und rekombinantem HSA mit Heparinoiden in ausgewählten Konzentrationen

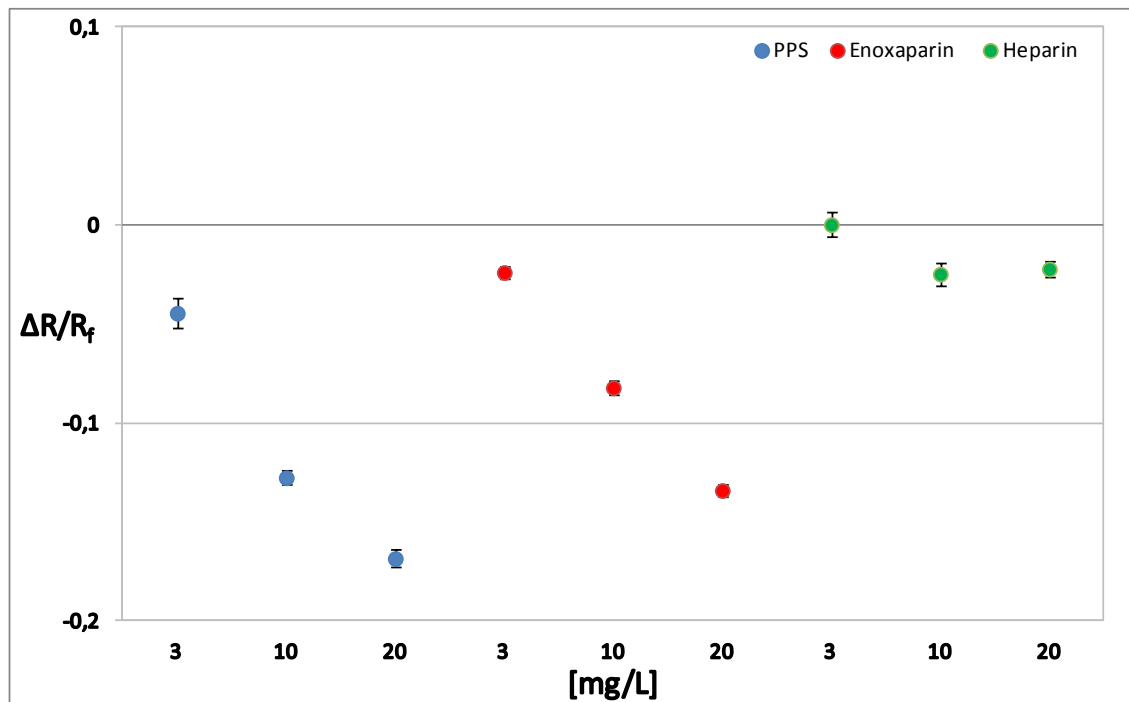
Da die bisher durchgeführten Experimente nur mit ein und derselben Charge der jeweiligen Albumine durchgeführt wurden, konnte man anhand der erhaltenen Daten keine allgemeine Aussage über das Interaktionsverhalten anderer Chargen und Produkte der beiden Albumine treffen. Aus diesem Grund wurden Wiederholungsexperimente mit zwei zusätzlichen Chargen von BSA (# A2153, Sigma-Aldrich) und HSA (# A1887, Sigma-Aldrich) durchgeführt. Außerdem wurde ein rekombinantes HSA-Protein (rHSA, exprimiert in *Pichia Pastoris*, # A7736, Sigma-Aldrich) herausgesucht, um den Einfluss der Herstellungsprozesse auf das Interaktionsverhalten von HSA mit den Heparinoiden zu untersuchen. Die Heparinoide, Heparin, PPS und Enoxaprin-Natrium wurden in 3 ausgewählten Konzentrationen, 3 mg/l, 10 mg/l und 20 mg/l für die Untersuchungen eingesetzt. Die Untersuchungen wurden bei 23 °C, mit der im Abschnitt 11.3.3 beschriebenen affinitätskapillarelektrophoretischen Methode durchgeführt.

Die Interaktionsdiagramme sind in Abbildungen 6-21, 6-22 und 6-23 dargestellt. Diese Interaktionen waren im Allgemeinen vergleichbar mit den Ergebnissen, die bei den ursprünglichen Chargen erhalten wurden. In allen drei Fällen waren die Interaktionen mit PPS am stärksten und abhängig von der eingesetzten Konzentration. Daraus kann man schließen, dass sich die Stärke der Interaktionen unabhängig von der eingesetzten Charge immer gleich verhält.

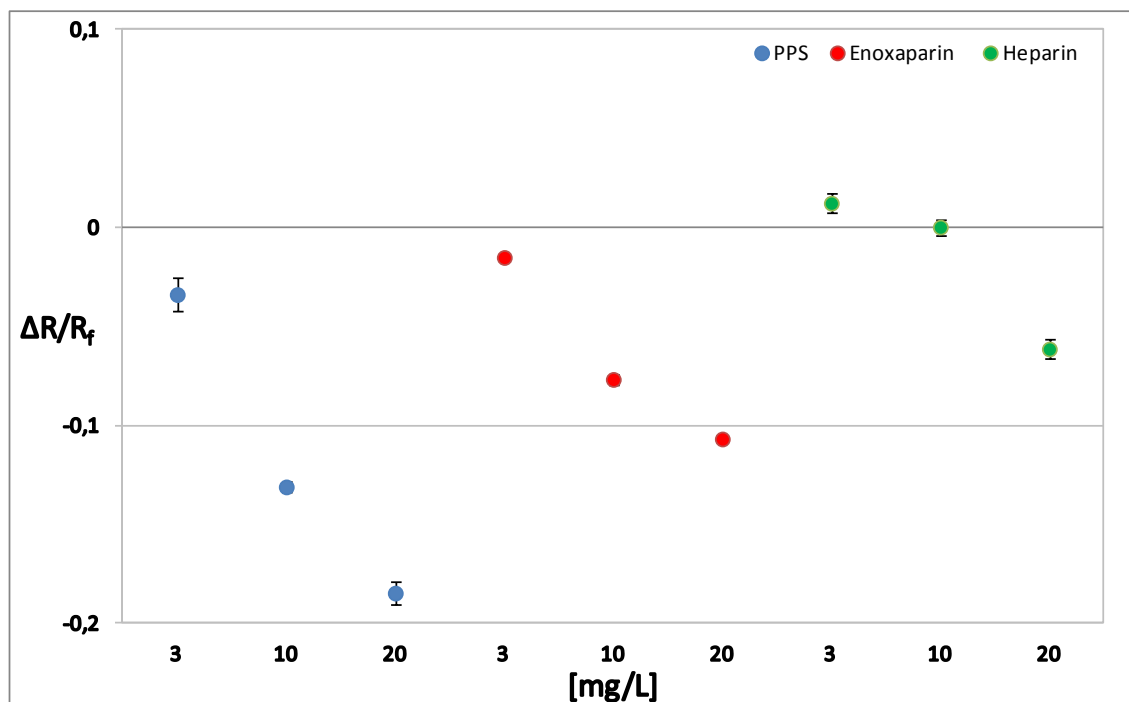


6-21 Interaktionsdiagramm von BSA (# A2153) mit PPS (blau), Enoxaparin-Natrium (rot) und Heparin (grün).

## Untersuchung der Wechselwirkungen von BSA und HSA mit ausgewählten Heparinoiden



6-22 Interaktionsdiagramm von HSA (# A1887) mit PPS (blau), Enoxaparin-Natrium (rot) und Heparin (grün).

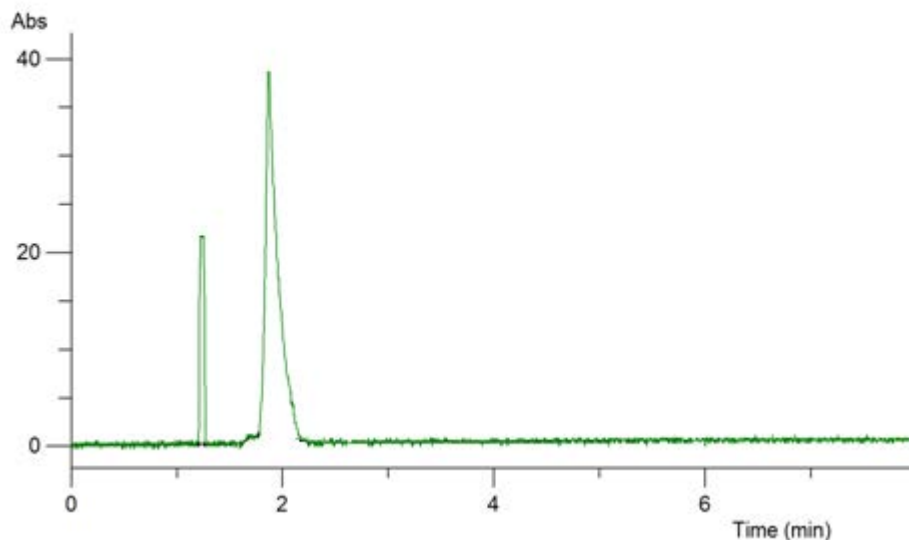


6-23 Interaktionsdiagramm von rHSA (exprimiert in Pichia Pastoris, # A7736) mit PPS (blau), Enoxaparin-Natrium (rot) und Heparin (grün).

Betrachtet man aber die Peakform der jeweiligen Albumine nach den Interaktionen, erkennt man, dass das rekombinante HSA sich nicht wie andere HSA-Chargen verhält. Während bei den anderen HSA-Chargen eine Aufspaltung der Peaks bereits ab einer PPS-Konzentration von 5 mg/l zu



erkennen war, konnte man bei dem rekombinanten HSA keine Aufspaltung, selbst nach dem Zusatz von 20 mg/l PPS erkennen. Abbildung 6-24 zeigt das Beispiel des rHSA-Peaks nach Zusatz von 10 mg/l PPS. Interessanterweise kann man hier keine Aufspaltung erkennen, während alle anderen eingesetzten Albumin-Chargen genau wie die ursprünglich eingesetzten Chargen eine eindeutige Aufspaltung der Peaks zeigen.



6-24 rHSA-Peak nach dem Zusatz von PPS 10 mg/l, in Tris-Puffer 20 mM bei 23 °C. Der erste und der zweite Peak stellen jeweils den Peak von dem EOF-Marker, und den rHSA-Peak dar.

### 6.3 Zusammenfassung

Die in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen haben erneut gezeigt, dass Heparinoide trotz gleicher Grundstruktur unterschiedliche Affinitäten zu Proteinen, in diesem Fall Albuminen, aufweisen. Bei den drei eingesetzten Heparinoiden, zeigte PPS die stärksten Interaktionen mit den beiden eingesetzten Albuminen, BSA und HSA, und zwar unabhängig von den eingesetzten Albumin-Chargen. Die Interaktionen von PPS mit HSA konnten bereits bei den niedrigen PPS-Konzentrationen (3 mg/l) festgestellt werden, eine Sättigung wurde bei einer PPS-Konzentration von 20 mg/l erreicht.

Die Messungen bei den zwei unterschiedlichen Temperaturen zeigten, dass Heparin keine signifikanten Wechselwirkungen mit BSA bei 23 °C aufwies. Erhöhte man aber die Messtemperatur auf 37 °C, konnte man

Wechselwirkungen bei den höheren Heparinkonzentrationen feststellen, die mit eindeutigen Veränderungen der Peakform von BSA einhergingen.

Das bemerkenswerteste Phänomen dieser Affinitätselektrophoretischen Untersuchungen stellte die Aufspaltung von HSA-Peaks nach den Interaktionen mit Heparin und PPS dar. Die Bindung von Heparin und PPS an HSA scheint die Konformation des HSA-Moleküls so zu modifizieren, dass mehrere Peak-Spezies erkennbar werden. Dieses Aufspaltungsverhalten konnte interessanterweise bei den Untersuchungen, die mit Enoxaparin-Natrium, ein niedermolekulares Heparin, durchgeführt wurden, nicht beobachtet werden.

Die Untersuchungen, die mit den unterschiedlichen Albumin-Chargen durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass sich nur das rekombinante HSA anders verhält als alle anderen eingesetzten Chargen. Man konnte bei dem rHSA keine Aufspaltungen, selbst bei einer Heparinoid-Konzentration von 20 mg/l beobachten.

Abschließend ist eine Betrachtung im Hinblick auf die Heterogenität sehr interessant. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist die genaue Ursache der Veränderung der Peakform von HSA noch unklar und muss genauer untersucht werden. Die Aufspaltung der Peaks könnte einerseits mit der Heterogenität der Albumine zusammenhängen, da sie bei rHSA nicht beobachtet werden konnte. Auf der anderen Seite könnte die Heterogenität der eingesetzten Heparinoide der Grund des unterschiedlichen Aufspaltungsverhaltens von HSA-Peaks sein, da dieses Verhalten bei Enoxaparin-Natrium nicht beobachtet werden konnte. Aus diesen Gründen ist es sehr wichtig, dieses Verhalten genauer zu untersuchen und zu verstehen, da Albumine und Heparinoide weit verbreitete Substanzen darstellen.

## 7 Einsatz kleiner Probenvolumina bei kommerziellen kapillarelektrophoretischen Instrumenten

### 7.1 Grund des Einsatzes kleiner Probenvolumina

Kapillarelektrophorese ist im Allgemeinen eine geeignete Technik zur Untersuchung von Arzneimitteln und Biopharmazeutika (siehe Abschnitt 2.1). Außerdem haben sich affinitätskapillarelektrophoretische Methoden in den letzten Jahren zur Untersuchung und Bewertung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Arzneistoffen, sowie zwischen Proteinen und Peptiden als nützlich erwiesen (siehe Abschnitt 2.2). Viele Proteine, die aus der analytischen Sicht sehr wichtig sind, werden von den Herstellern in sehr kleinen Mengen (Mikrogramm-Bereich) angeboten. Dazu gehören beispielsweise zahlreiche Enzyme, Entzündungsfaktoren, Gerinnungsfaktoren und funktionelle Peptide. Außerdem sind die Preise, die für die kleinen Probenmengen von den Herstellern gefordert werden, extrem hoch. Zum Beispiel kostet der Gewebeinhibitor der Metalloprotease 3 (TIMP3) ca. 408 € pro 10 µg [76].

Aus diesen Gründen ist es wichtig, einen Weg zu finden, durch den das eingesetzte Probenvolumen reduziert werden kann. Zwar zeichnet sich die Kapillarelektrophorese durch sehr geringe Probenvolumina aus, die nur im Nanoliter-Bereich liegen, jedoch erfordern technische Gegebenheiten der Geräte den Einsatz wesentlich höherer Volumina, die für die Injektion effektiv zur Verfügung gestellt werden müssen. Das Probenvolumen, das in die Kapillare injiziert wird, lässt sich nach der Formel 7-1 berechnen [76,77].

$$V_{inj.} = \frac{\Delta P \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t}{8 \cdot \eta \cdot l_{ges}} \quad (7-1)$$

$\Delta P$ :	<i>Injektionsdruck [mbar]</i>
$r$ :	<i>Innenradius der Kapillare [m]</i>
$t$ :	<i>Injektionszeit [s]</i>
$l_{ges}$ :	<i>Kapillarlänge [m]</i>
$\eta$ :	<i>Dynamische Viskosität [N.s.cm<sup>-2</sup>]</i>

Demnach ist beispielsweise das injizierte Probenvolumen bei einer kapillarelektrophoretischen Untersuchung mit einer Kapillare, die eine Totallänge von 31 cm und einen Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  aufweist, etwa 14,8 nl, wenn die Probe bei einem Druck von 50 mbar 6 Sekunden injiziert wird.

Weitere Vorteile des Einsatzes kleiner Probenvolumina sind geringerer Verlust von wertvollen Materialien und Erzeugung von kleineren Abfallmengen [76,78,79].

## **7.2 Vorgehensweise, Probenvorbereitung und Eignungstest mittels Standardproteinen**

Die meisten kapillarelektrophoretischen Geräte, mit denen in der Forschung gearbeitet wird, haben Mikroliter- und Milliliter-Gefäße für die Proben im Angebot. Das Kapillarelektrophoresegerät, mit dem im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde (siehe Abschnitt 11.1.1), bietet 4-ml-Vials für Pufferlösungen, und Lösungen zur Spülungen, und 300  $\mu\text{l}$  Vials für die Probelösungen an. Die Mikroliter-Vials sind so aufgebaut, dass sie ein gewisses Volumen am Boden des Gefäßes aufweisen, das von der Kapillare nicht zu erreichen ist (siehe Abbildung 11-2), das sogenannte Totvolumen. Da die effektive Länge der Kapillare in den meisten Fällen nicht einstellbar ist und vom Hersteller vorgegeben wird, kann das Totvolumen zur Analyse nicht verwendet werden. Selbst wenn die Kapillarlänge einstellbar wäre, würde die Gefahr bestehen, dass die Kapillare nach dem Erreichen der Gefäßbodens an dem Detektionsfenster durch den hohen Widerstand brechen würde.

Aus diesen Gründen wurde als eine inerte, mit Wasser nichtmischbare Flüssigkeit, Silikonöl (siehe Abschnitt 11.3.4) eingesetzt, um das Totvolumen damit zu befüllen (siehe Abbildung 11-1).

Für die Ermittlung des Totvolumens wurden aufeinanderfolgende Messungen von einem bekannten Protein (HSA) in verschiedenen Einsatz-Mengen durchgeführt. Dadurch wurde ein Totvolumen von 10  $\mu\text{l}$  ermittelt. Somit konnte die eingesetzte Probenmenge auf mindestens die Hälfte reduziert werden, in dem die Proben in die mit Silikonöl befüllten Probengefäße auf die Silikonöl-Schicht gegeben wurde (siehe Abbildung 11-2).

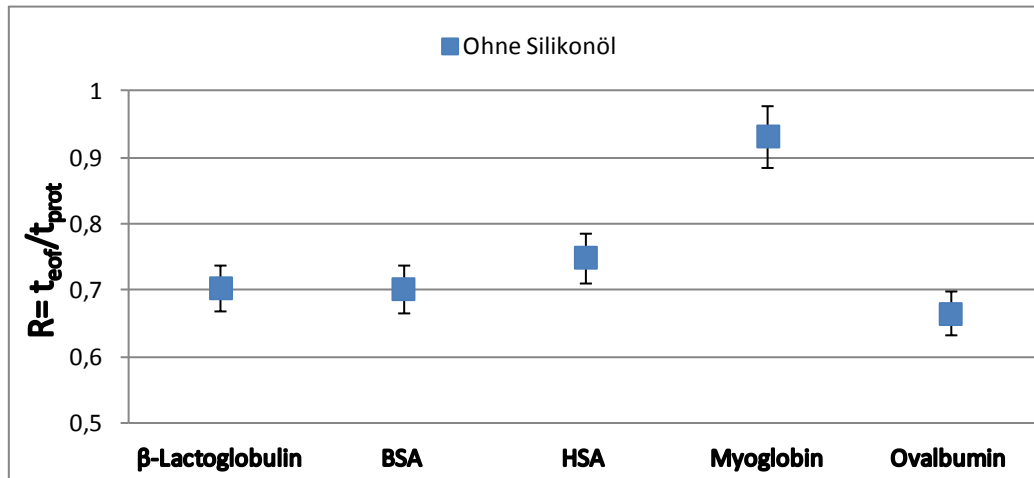
Zur Ermittlung der Eignung dieser Methode für die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wurden Experimente mit Standardproteinen, nämlich  $\beta$ -Lactoglobulin (siehe Abschnitt 5.1.1), BSA (siehe Abschnitt 5.1.2), HSA (siehe Abschnitt 5.1.3), Myoglobin (siehe Abschnitt 5.1.4) und Ovalbumin (siehe Abschnitt 5.1.5) in Ab- und Anwesenheit von Silikonöl durchgeführt (siehe Abschnitt 11.3.3) und die Ergebnisse der Mobilitätsverhältnisse und Peakflächen miteinander verglichen.

Außerdem wurden affinitätskapillarelektrophoretische Untersuchungen von HSA und Vitronectin (siehe Abschnitt 5.1.6) mit 3 verschiedenen Heparinoiden ebenfalls in Ab- und Anwesenheit von Silikonöl durchgeführt und der Einfluss von Silikonöl auf die untersuchte Affinitäten ermittelt.

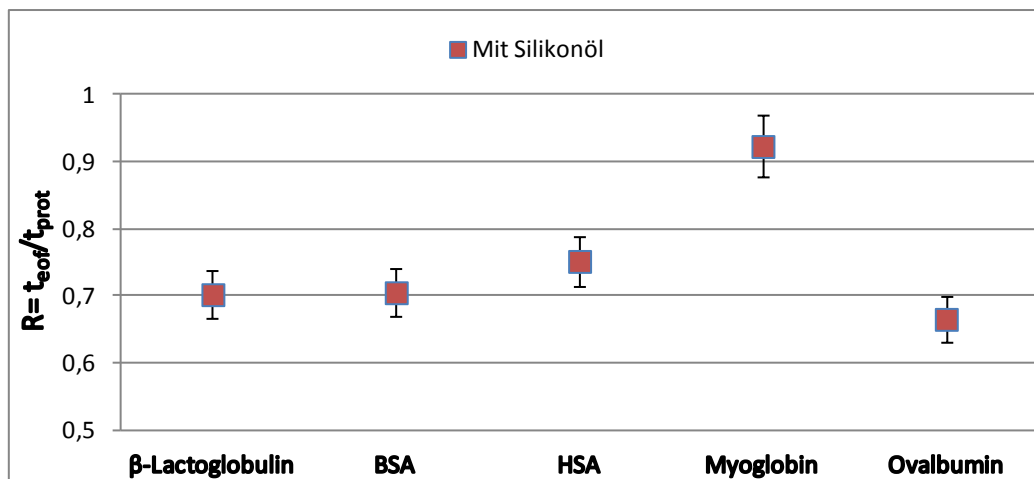
### **7.3 Ergebnisse**

#### **7.3.1 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen der Standardproteine in Ab- und Anwesenheit von Silikonöl**

Die Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen von den fünf eingesetzten Standardproteinen sind in Abbildungen 7-1 bis 7-3 dargestellt. Werden die Mobilitätsverhältnisse (siehe Abschnitt 2.2.4) betrachtet, wird beobachtet, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Untersuchungen, die ohne Zusatz vom Silikonöl (siehe Abbildung 7-1) und derjenigen, die in Anwesenheit vom Silikonöl durchgeführt wurden (siehe Abbildung 7-2) zu erkennen ist.

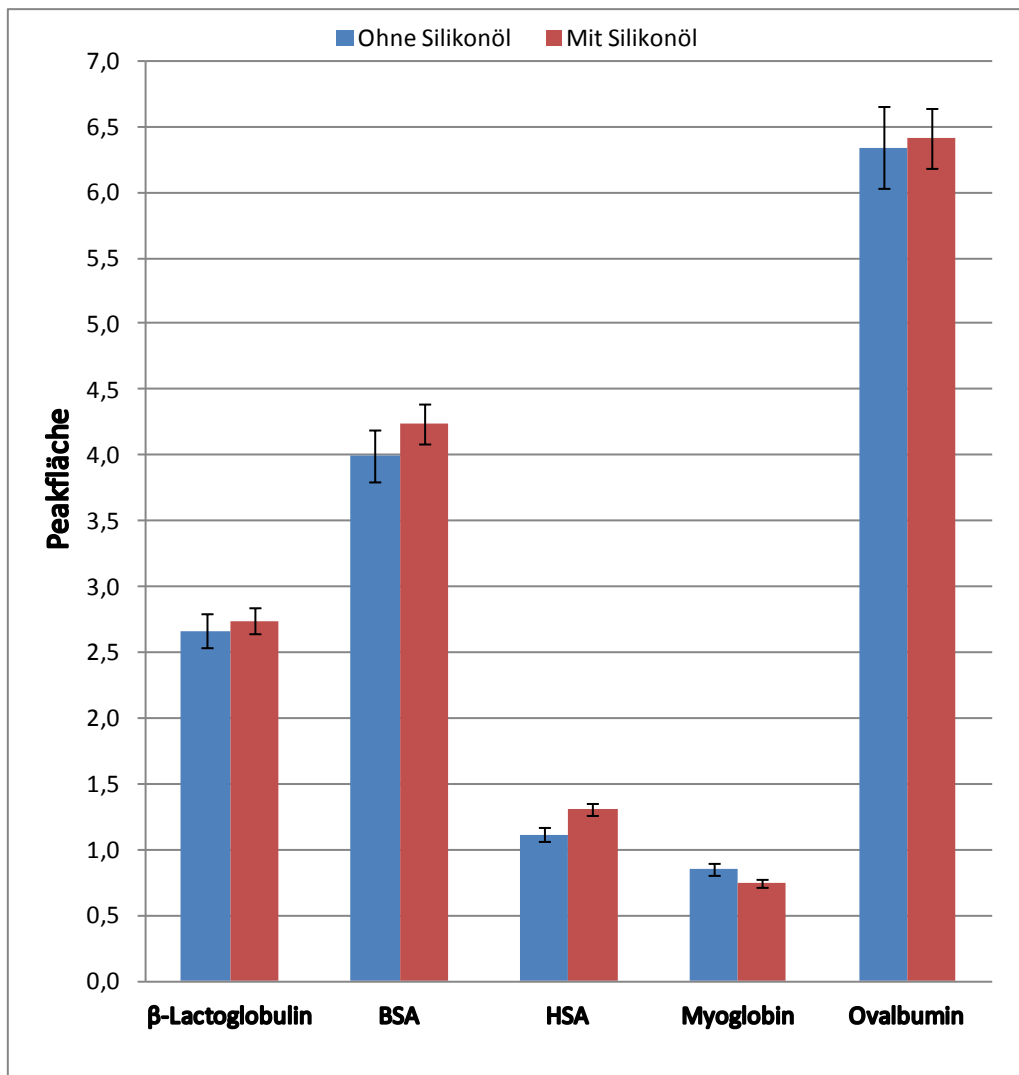


7-1 R-Werte der Standardproteine, ermittelt in Abwesenheit vom Silikonöl.



7-2 R-Werte der Standardproteine, ermittelt in Anwesenheit vom Silikonöl.

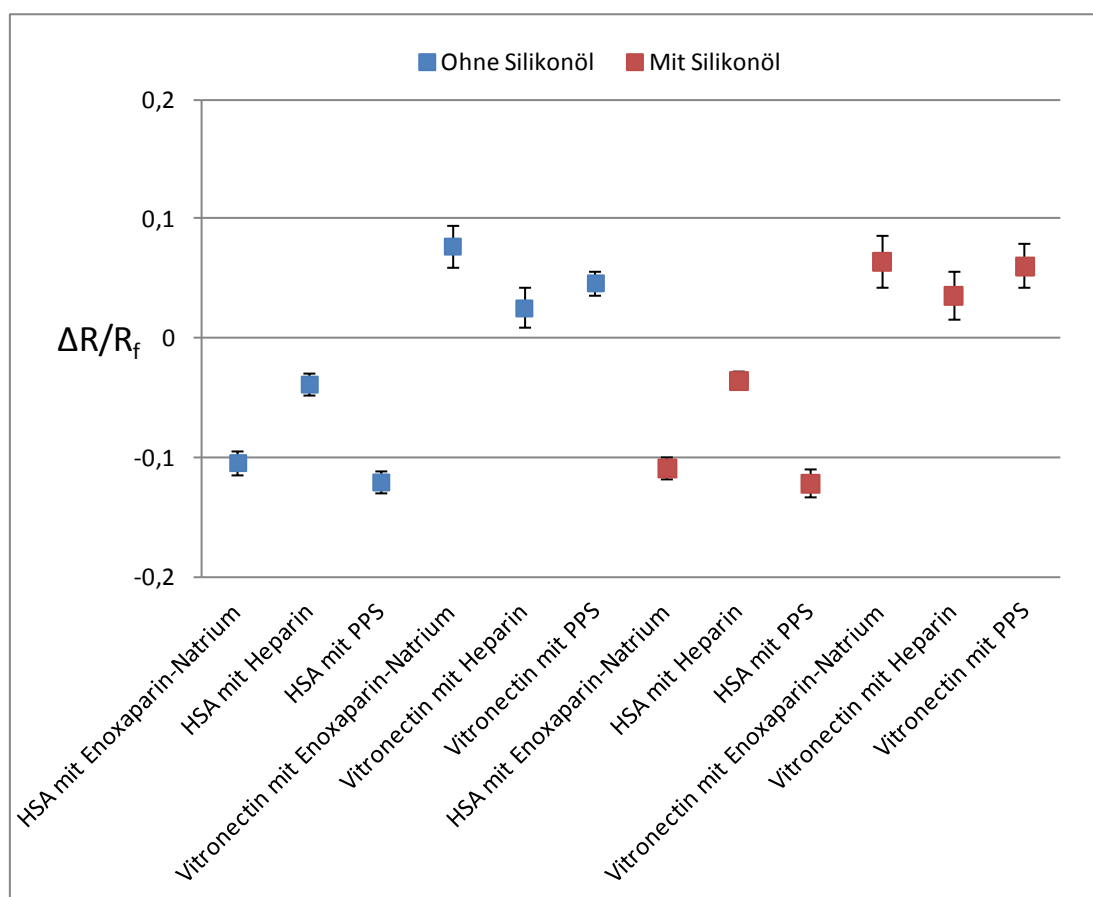
Ebenso hat die Auswertung der Peakflächen der untersuchten Proteine in Ab- und Anwesenheit von Silikonöl keinen signifikanten Unterschied und keinen negativen Einfluss des eingesetzten Silikonöls auf die Ergebnisse gezeigt (siehe Abbildung 7-3).



7-3 Vergleich der ermittelten Peakflächen der eingesetzten Standardproteinen in Ab- und Anwesenheit vom Silikonöl.

### 7.3.2 Affinitätskapillarelektrophoretische Untersuchungen von HSA und Vitronectin in Ab- und Anwesenheit von Silikonöl

Es wurde eine schon bekannte affinitätskapillarelektrophoretische Methode (siehe Abschnitt 11.3.3) zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen, nämlich HSA und Vitronectin und den 3 Heparinoiden Enoxaprin-Natrium (siehe Abschnitt 2.3.2.2), Heparin (siehe Abschnitt 2.3.2.1) und PPS (siehe Abschnitt 2.3.2.4) herangezogen, um den Einfluss von Silikonöl auf die Ergebnisse zu beobachten. Wie es in der Abbildung 7-4 gut zu erkennen ist, hatte Silikonöl keinen signifikanten und negativen Einfluss auf die Ergebnisse der Affinitäten über die Dauer der Analyse.



7-4 Affinitätsuntersuchungen von HSA und Vitronectin mit Enoxaparin-Natrium, Heparin und PPS, ermittelt in Ab- und Anwesenheit vom Silikonöl.



#### **7.4 Zusammenfassung**

Die Verwendung von Silikonöl zur Füllung des Totvolumens war sehr erfolgreich und lieferte hochreproduzierbare Ergebnisse. Die erreichte Reduktion des eingesetzten Probevolumens auf 10 µl ist ein akzeptables Volumen für routinemäßige kapillarelektrophoretische Untersuchungen und dieses komplette Volumen konnte nahezu verlustfrei injiziert werden. Da viele wertvolle Proteinproben sehr teuer sind und meistens in einer Menge von 10 µg geliefert werden, kann man mit dieser Methode eine gut nachweisbare Probenkonzentration von 1 mg/ml herstellen und das gesamte Volumen für die Untersuchungen einsetzen. Ein weiterer Punkt des Einsatzes von mindestens 10 µl Probenvolumen besteht darin, dass damit die Gefahr des Probenverlustes durch die Verdunstungseffekte minimal gehalten werden kann [76].

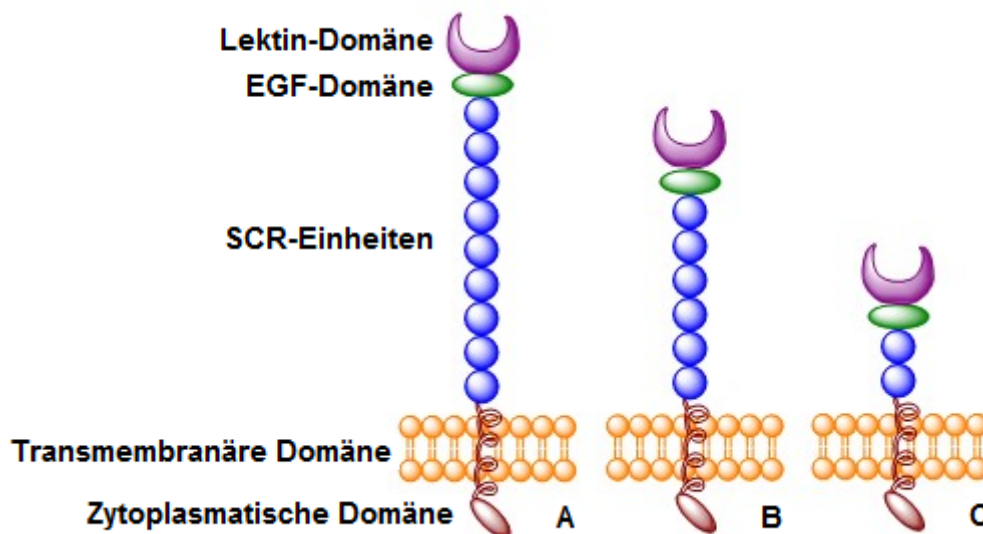
Diese Methode der Probenreduktion wurde bei den Folgeexperimenten von P-Selektin, die im Kapitel 8 behandelt werden, erfolgreich verwendet.

## **8 Untersuchung der Wechselwirkungen des Adhäsionsproteins P-Selektin mit Heparinoiden**

### **8.1 Struktur und physiologische Funktion von P-Selektin**

P-Selektin ist ein wichtiges Protein in der Koagulationskaskade und gehört zur Familie der Selektine [80,81]. Selektine sind eine Gruppe von Adhäsionsproteinen, die auf Leukozyten, Blutplättchen und Endothelzellen präsentiert werden. Je nach zellulärer Lokalisation unterteilt man die Selektine in drei Unterklassen. E-Selektin befindet sich auf Endothelzellen, L-Selektin ist auf Leukozyten lokalisiert und P-Selektin kann man sowohl auf Thrombozyten als auch auf Endothelzellen finden [82–84]. Alle Selektine weisen einen ähnlichen Aufbau auf. Sie gehören zur Klasse der Lektine, das sind Proteine mit spezifischen Bindungsstellen für Kohlenhydrate, die sich auf der Zelloberfläche befinden [85]. Da die Kohlenhydratbindung bei den Selektinen abhängig von der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist, werden die Selektine der Gruppe der C-Typ-Lektine zugeordnet [85,86]. Der allgemeine Aufbau der Selektine sieht folgendermaßen aus: An dem Amino-Terminus befindet sich eine Lektin-Domäne, die aus etwa 120 Aminosäuren zusammengesetzt ist [87], und eine Sequenzhomologie von ca. 65 % innerhalb der drei Selektine aufweist [88]. Nach dieser Domäne folgt ein epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)-ähnlicher Bereich mit 35 bis 40 Aminosäuren [88]. Dieser Domäne folgt eine Reihe von sogenannten „Short Consensus Repeats“ (SCRs), die je nach Selektin, variabel in der Anzahl sind. Jede SCR besteht aus etwa 60 Aminosäuren [88]. Die Aneinanderreihung von den SCRs spielt eine wichtige Rolle für die räumliche Ausdehnung der Selektine auf der Zelloberfläche [88]. Die Anzahl der SCRs ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von den Selektinen [88]. Während humanes L-Selektin nur zwei SCRs aufweist, sind E-Selektin und P-Selektin mit 6 bzw. 9 SCRs wesentlich längere Selektine [88]. Die Selektine sind in der Zellmembran über eine Transmembran-Region verankert, der eine abschließende C-terminale zytoplasmatische Domäne folgt [88]. Selektine ermöglichen im Allgemeinen den ersten temporären Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen, bei dem die Leukozyten langsamer werden und die Zellsignale, wie endotheliale Mediatoren, aufnehmen können [88,89].

Der allgemeine Aufbau von den Selektinen ist in der Abbildung 8-1 schematisch dargestellt.



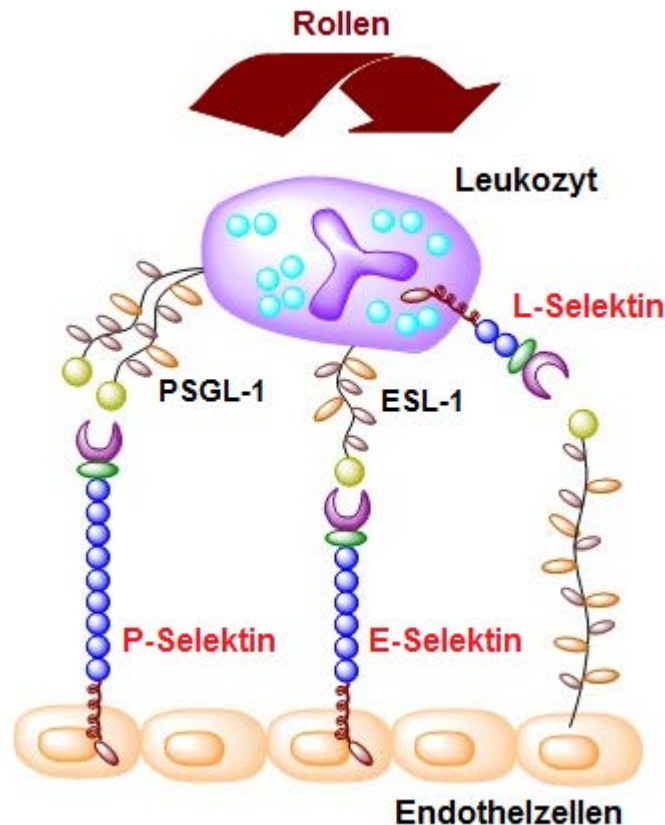
8-1 Schematische Darstellung des Selektin-Aufbaus. A: P-Selektin, B: E-Selektin, C: L-Selektin. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [82].

P-Selektin (Synonym: GMP140, CD62P oder PADGEM) [90,91] ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 140 kDa, das in Alpha-Granulaten von Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen konstitutiv exprimiert und produziert wird [82,91–95]. Das Präsentieren von P-Selektin auf der Zelloberfläche wird durch zwei verschiedene Mechanismen gesteuert. Nach der Stimulation der Zellen mit Histamin, Thrombin oder Phorbol ester, wird P-Selektin aus den Speicherkörpern mobilisiert, wobei die maximale Expression von P-Selektin innerhalb von 5 Minuten an der Zelloberfläche erreicht wird [83,92]. Zusätzlich wird P-Selektin durch Aktivierung der Transkription, z.B. TNF-Alpha neu synthetisiert. P-Selektin wird dann durch Endozytose internalisiert [83,96].

Der Ligand von P-Selektin, der in den letzten Jahren gut erforscht und charakterisiert wurde, wird P-Selektin-Glykoperoteine-Ligand-1 (PSGL-1) genannt [83,93]. PSGL-1 gehört zur Familie der Mucin-ähnlichen Proteine, die hydrophile Glykoproteine mit verzweigten Kohlenhydratketten darstellen. PSGL-1 ist ein langgestrecktes Homodimer, wobei die Dimere über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Das Molekulargewicht von PSGL-1

beträgt ca. 240 kDa [96]. PSGL-1 unterliegt zwei posttranslationalen Modifikationen, die für seine Bindungsaktivität essentiell sind: eine Sulfatierung [97], und die Addition des Tetrasaccharids Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) zu seinen O-verknüpften Glykanen [98,99]. Die Homodimerstruktur von PSGL-1 ist wahrscheinlich für seine hochaffine Bindung an P-Selektin notwendig [95,100–102]. Durch eine Wechselwirkung mit PSGL-1 bewirkt P-Selektin die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregationen, bei denen die Bindung zwischen Neutrophilen an Thrombozyten oder Neutrophilen an Endothelzellen vermittelt wird [100,103]. Darüber hinaus ist P-Selektin zusammen mit den anderen Selektinen an der Signaltransduktion beteiligt [103]. Bestimmte Signale verleihen den Leukozyten die Aktivierung, die Migration und die Wechselwirkung mit dem P-Selektin, durch die Leukozyten die unmittelbare Nähe zur aktivierten Gefäßwand erreichen [89,104] (siehe Abbildung 8-2). Außerdem spielt P-Selektin bei den Thrombozyt-Plättchen-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle, die für die Bildung der Thrombozyten-Aggregate bei Gefäßverletzungen zuständig sind [89,104]. Die Thrombozytenaggregation ist ebenfalls ein wichtiger Faktor bei der arteriellen Thrombose. Eine ungewöhnlich erhöhte Expression von P-Selektin auf Thrombozyten findet sich bei den Erkrankungen, die mit arterieller Thrombose einhergehen, wie koronare Herzkrankheiten, Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Erkrankungen [104,105]. Weiterhin wurde bei einer Vielzahl von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ein erhöhter Plasmaspiegel von gelöstem P-Selektin gefunden [104,105]. Darüber hinaus induziert die Wechselwirkung von P-Selektin mit seinem natürlichen Liganden, PSGL-1, eine erhöhte Produktion von Gewebefaktoren und von verschiedenen Zytokinen in Leukozyten, und unterstützt somit einen prothrombotischen Zustand [104,105].

Aus diesen Gründen ist es von großer Bedeutung, die Wechselwirkungen von P-Selektin mit seinen potentiellen Inhibitoren (z.B. Heparin [106]) zu erforschen und zu untersuchen. Dies könnte neue Therapieansätze für die Erkrankungen bringen, bei denen eine erhöhte Expression von P-Selektin eine entscheidende Rolle spielt.



8-2 Schematische Darstellung der humanen Selektine und des „Rollens“ von Leukozyten. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [82].

## 8.2 Affinitätskapillarelektrophoretische Untersuchungen unter Volumenreduktion

Wie im Kapitel 7 beschrieben, erwies sich der Einsatz kleiner Probenvolumina als eine vorteilhafte Methode, vor allem bei den Proben, die relativ hohe Kosten aufweisen. Zu den wertvollen Proteinen mit hohen Kosten gehört u.a. P-Selektin. Für die affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchungen von P-Selektin wurde das eingesetzte Probenvolumen mit der unter Abschnitt 11.3.4 beschriebenen Methode, von 20 µl auf 10 µl reduziert. Das Protein wurde in 50 µg-Menge vom Hersteller geliefert. Unmittelbar nach dem Erhalt wurde die gesamte Menge von gelieferten P-Selektin in Tris-Puffer gelöst, in fünf Portionen je 10 µl aliquotiert und sofort eingefroren. Somit konnte man für jede Untersuchungsserie eine Portion unmittelbar vor der Messung auftauen.

### **8.2.1 Versuchsaufbau und eingesetzte Heparinoide**

Die affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchungen von P-Selektin und zwei Heparinoiden, PPS (siehe Abschnitt 2.3.2.4) und Heparin (siehe Abschnitt 2.3.2.1) wurden in einem ersten Schritt, wie gewohnt, in einer unbeschichteten Kapillare durchgeführt. Da die Adsorption des relativ großen Proteins, P-Selektin, an der Kapillarwand sehr hoch war, konnten keine Peak-Signale erfasst und dementsprechend keine Ergebnisse erzielt werden. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Untersuchungen in einer LPA-beschichteten Kapillare, mit der Methode, die unter dem Abschnitt 11.3.5 beschrieben ist, durchgeführt.

Die beiden Heparinoide wurden in den Konzentrationen von 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, 50 mg/l und 100 mg/l eingesetzt.

Da das P-Selektin für die Wechselwirkung mit seinem natürlichen Liganden, PSGL-1 im Körper, auf das Vorhandensein von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen angewiesen ist, mussten für die Affinitätsuntersuchungen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zugesetzt werden. Dazu wurden zwei verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Lösungen, 1 mmol/l und 2 mmol/l hergestellt (aus  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Stammlösung: siehe Tabelle 11-7), mit denen die Untersuchungen durchgeführt wurden. Um aber Aussagen über das Bindungsverhalten von P-Selektin gegenüber den beiden Heparinoiden bei fehlenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu gewinnen, wurden die Untersuchungen auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durchgeführt. Somit konnten die Affinitäten in Ab- und Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen miteinander verglichen und die Stärke der jeweiligen Bindungen ermittelt werden.

### **8.2.2 Ergebnisse**

Die Ergebnisse der affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchungen sind in der Abbildung 8-3 dargestellt. Eindeutig zu erkennen ist, dass wenn auch schwache Wechselwirkungen zwischen P-Selektin und den Heparinoiden bestehen. Allerdings ist das Ausmaß der Mobilitätsverschiebung nicht stark ausgeprägt und nicht auffällig, obwohl die Wirkung der Heparinoide auf P-Selektin schon in niedrigen mg/l-Konzentrationen messbar ist, die offensichtlich mit dem Vorhandensein von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verknüpft ist (siehe Abbildung 8-3, B und C). Auf den ersten Blick weisen die Bindungskurven mit maximaler Steilheit

zwischen 2 und 5 mg/l nur eine mäßige Bindungsstärke auf. Allerdings sollte in Betracht gezogen werden, dass P-Selektin ein relativ großes Protein (140 kDa) ist. Dementsprechend ist die Veränderung des Ladung-Masse-Verhältnisses, die aus den Wechselwirkungen resultiert, im Vergleich zu den Studien, bei denen kleine Proteine untersucht werden, verhältnismäßig gering [107].

Die Messung der Wechselwirkungen wurde zunächst mit sechs ausgewählten Heparinoidkonzentrationen (0,5, 1, 2, 5, 50 und 100 mg/l) durchgeführt. Um betätigen zu können, dass die Datenpunkte eine echte Bindungskurve darstellen, wurden die Untersuchungen mit PPS 1 mg/l, 50 mg/l und Heparin 50 mg/l teilweise wiederholt. Außerdem wurde noch zusätzlich eine Konzentration von jeweils 3 mg/l Heparinoid, auf die Wechselwirkung mit P-Selektin untersucht (siehe Abbildung 8-4, A-C). Es wurde angenommen, dass eine Konzentration von etwa 3 mg/l nahe dem Wendepunkt der Bindungskurve liegen muss. Die Auswertung der Ergebnisse hat diese Annahme bestätigt.

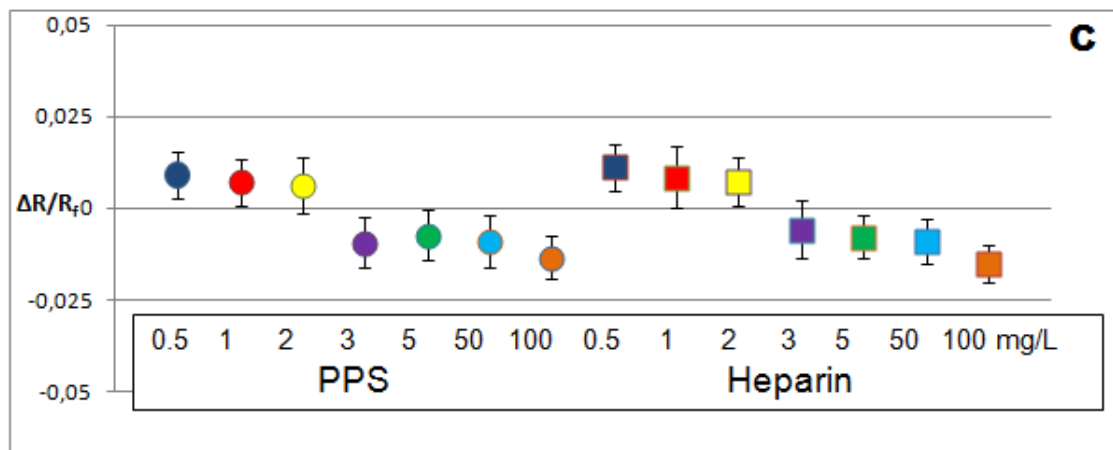
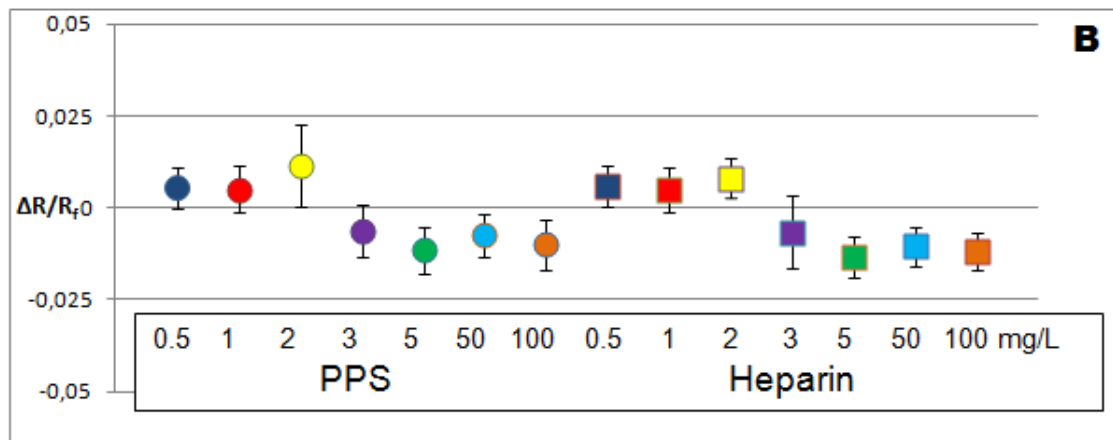
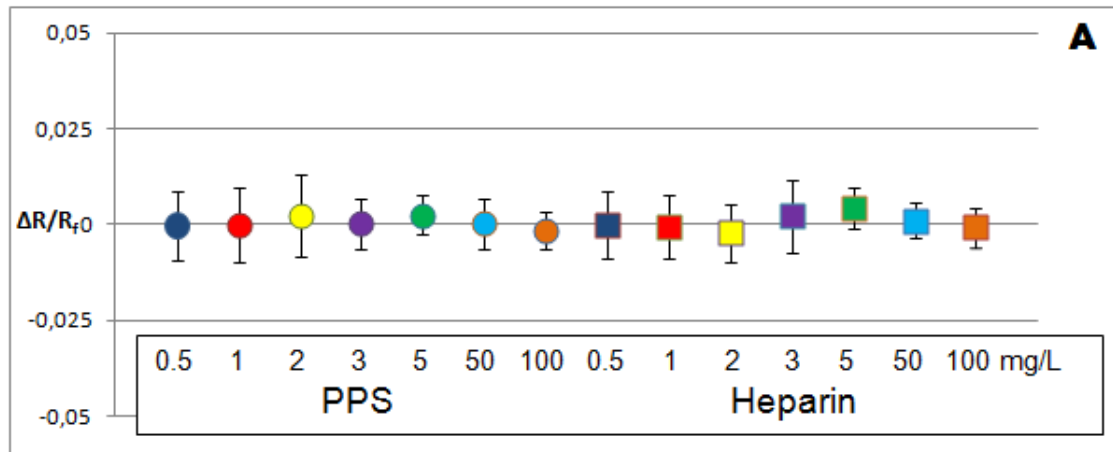
Anhand der beiden Abbildungen 8-3 und 8-4 kann man erkennen, dass PPS und Heparin keine signifikanten Wechselwirkungen mit P-Selektin ohne Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zeigen (Abbildungen 8-3, A und 8-4, A). Der Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führte zur folgenden Beobachtung: Unterhalb einer Heparinoidkonzentration von 3 mg/l konnte man lediglich eine Wechselwirkung von P-Selektin mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beobachten, die zu einer Verschiebung der  $\Delta R/R_f$ -Werte in die positiven Richtung führte. Erst ab einer Heparinoidkonzentration von 3 mg/l konnten die Interaktionen von P-Selektin mit den Heparinoiden erfasst werden. Die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und das Zusammenspiel von den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zusammen mit Heparinoiden ab einer Konzentration von 3 mg/l führten dazu, dass P-Selektin offenbar insgesamt negativer geladen wurde. Dementsprechend tauchten die  $\Delta R/R_f$ -Werte im negativen Bereich auf. Darüber hinaus kann man erkennen, dass weder eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration noch der Heparinoid-Konzentration zu einer Stärkung der Wechselwirkungen führte. Durch die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration konnte lediglich eine bessere Auflösung der Peaks erreicht werden (siehe Abbildung 8-5). Das Wechselwirkungsdiagramm zeigte eine sigmoidale Kurve, aus der die Konzentration der halbmaximalen Wirkung der Heparinoide von etwa 3 mg/l abgeleitet werden könnte. Interessanterweise

haben Wang et al. über einen IC<sub>50</sub>-Wert von 3 µM Heparin zur Hemmung der Adhäsion von A375-Zellen am immobilisierten P-Selektin berichtet, der in einer ähnlichen Größenordnung liegt [108].

Die beobachtete Steigung der Kurve ist allerdings sehr steil, was durch die Beteiligung von mehr als zwei Komponenten erklärt werden kann. Die anderen Komponenten könnten Konformationsvarianten von P-Selektin sein, die durch die anfängliche Bindung von Liganden an P-Selektin induziert werden. Diese Zwischenstufen werden entweder durch Ligandbindung, die über sekundäre Bindungsstellen stattfinden, oder durch Bildung größerer Komplexe, wie eine Dimerisierung von P-Selektin, stabilisiert. Sekundäre Bindungsstellen wurden bereits für Heparin auf Antithrombin III gefunden, die die Wechselwirkung mit Thrombin modifizieren [109]. Weiterhin würde der Erhalt einer sigmoidalen Kurve darauf hindeuten, dass P-Selektin mehrere Bindungsstellen für Liganden aufweist, und die Bildung einer kooperativen Bindung wahrscheinlich ist. Die kooperative Bindung erfolgt in Bindungssysteme, die mehr als eine Spezies von Molekülen enthalten. In solchen Systemen kann eine Spezies mehr als ein Molekül der anderen Spezies binden. Diese Art der kooperativen Bindung tritt bei vielen biologisch wichtigen Proteinen auf [110]. In diesen Fällen kann der genaue Wert der Bindungskonstante aus der Bindungskurve nicht direkt abgeleitet werden, wie es bei P-Selektin auch sehr wahrscheinlich der Fall ist.

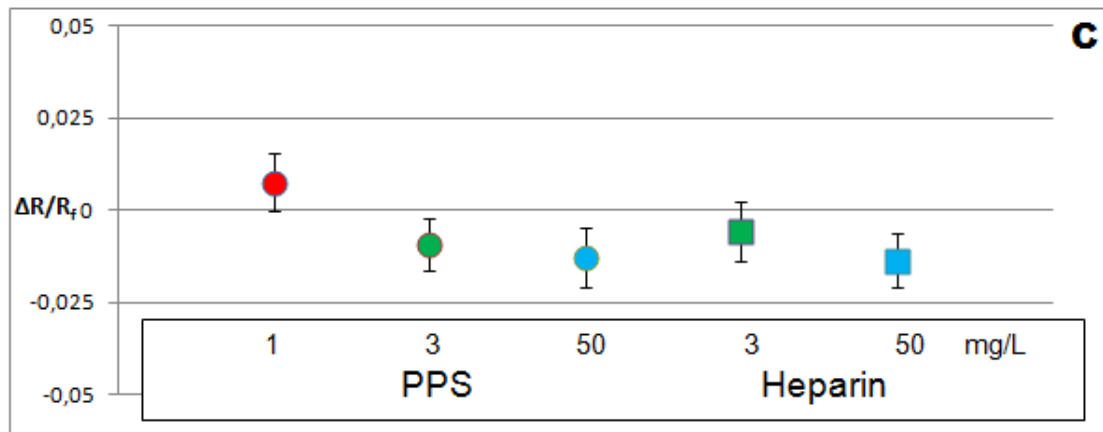
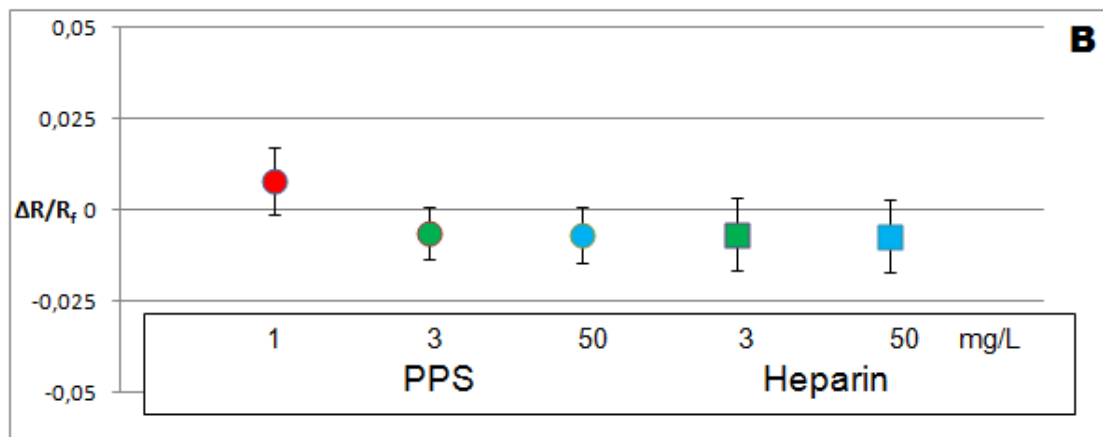
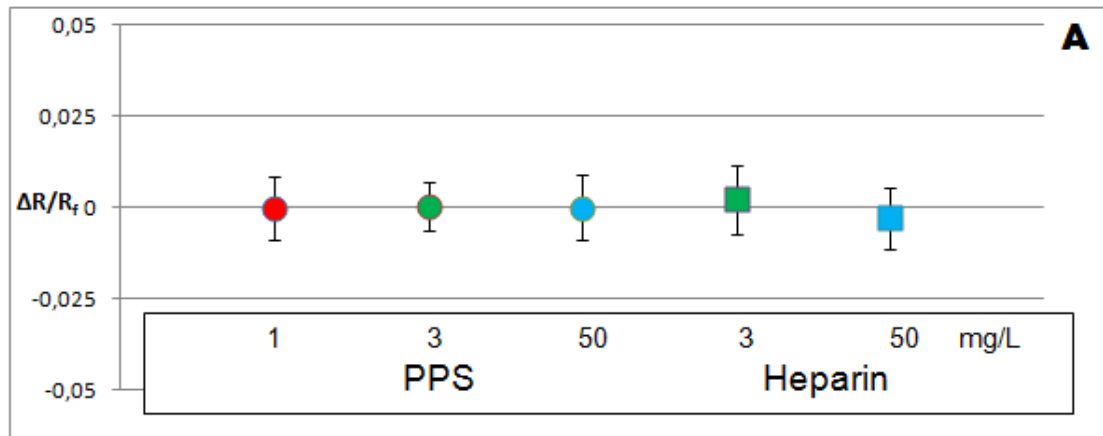


# Untersuchung der Wechselwirkungen des Adhäsionsproteins P-Selektin mit Heparinoiden

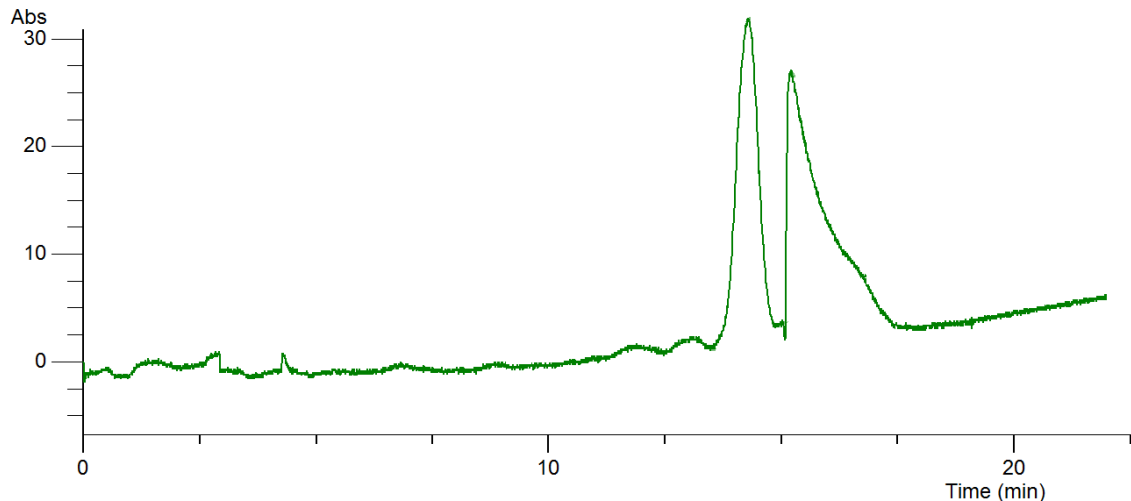


8-3 Interaktionen von P-Selektin mit PPS und Heparin in sieben verschiedenen Konzentrationen, in 20 mmol/l Tris-Puffer, pH 7,4. A: Ohne Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, B: Nach Zusatz von 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, C: Nach Zusatz von 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

## Untersuchung der Wechselwirkungen des Adhäsionsproteins P-Selektin mit Heparinoiden



8-4 Interaktionen von P-Selektin mit PPS und Heparin, Wiederholungsexperiment mit 1 mg/l PPS, 50 mg/l PPS, 50 mg/l Heparin und eine zusätzliche Konzentration von 3 mg/l von beiden Heparinoiden, in 20 mmol/l Tris-Puffer, pH 7,4. A: Ohne Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, B: Nach Zusatz von 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, C: Nach Zusatz von 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.



8-5 Elektropherogramm von P-Selektin (195 nm) nach dem Zusatz von 100 mg/l PPS als Ligand, in Anwesenheit von 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Pufferlösung. Erster Peak: Acetanilid, zweiter Peak: P-Selektin. In 20 mmol/l Tris-Puffer, pH 7,4.

### 8.3 Computergestütztes Docking mit MOE

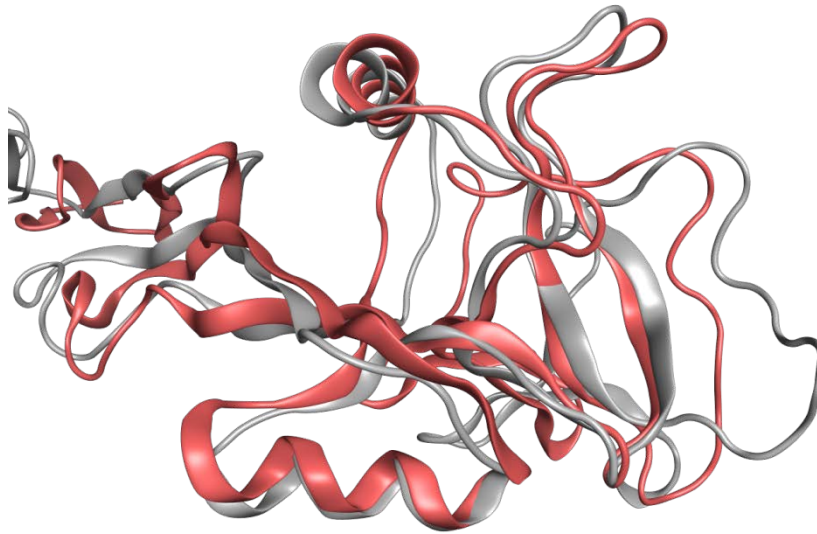
Da die affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchungen (Abschnitt 8.2) keine eindeutigen Aussagen über die Affinitätsstärken der Heparionoide zu P-Selektin zuließen, und sich auch keine Erkenntnisse über die Natur der Heparionoid - P-Selektin-Bindestellen ableiten ließen, sollte mit Hilfe von Computermodellen versucht werden, hier einen Einblick zu gewinnen. Dazu wurde das bewährte Programm, MOE™ (*Molecular Operating Environment*, Chemical Computing Group ULC) für diesbezügliche Docking Experimente verwendet. Docking charakterisiert die Einpassung von Liganden in die Bindetasche eines potentiellen Targets mit Hilfe eines chemoinformatischen Modells. Die generierten Bindungsposen werden mit Hilfe einer geeigneten Scoring Funktion z.B. nach ihrer freien Bindungsenergie geordnet werden und lassen dann Rückschlüsse auf die Bindungsaffinitäten zu.

#### 8.3.1 Einführung, Versuchsbedingungen und Validierung der verwendeten Methode

Um den Komplexitätsgrad der Berechnungen, der beim Docking langkettiger Polysaccharide entsteht, zu vermindern, wurde stellvertretend für Heparin das synthetische Pentasaccharid und kürzeste bekannte Heparionoid Fondaparinux als Modells substanz ausgewählt. Analog dazu wurden fünf Saccharid-Einheiten

von PPS verwendet, um die gleiche Anzahl der Einheiten, und dementsprechend eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten..

Um den Bindungsmodus des Antikoagulans Fondaparinux und PPS zu P-Selektin ermitteln zu können, wurde in einem ersten Schritt die Protein Datenbank (PDB) [111] nach einer geeigneten Kristallstruktur von P-Selektin, die mit einem Antagonisten kokristallisiert wurde, durchsucht. Da eine solche Kristallstruktur in der Datenbank nicht enthalten war, wurde die Suche erweitert und richtete sich diesmal auf ein mit einem Agonisten kokristallisiertes - P-Selektin. Es wurde eine Kristallstruktur aus zwei Domänen, Lektin und EGF-Domäne (nachfolgend als Di-Domäne bezeichnet), des menschlichen P-Selektins, kokristallisiert mit Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (PDB-Code 1G1R) gefunden [112]. Sialyl-Lewis<sup>x</sup> hat eine agonistische Wirkung an P-Selektin. Um die Eignung der gefundenen Di-Domäne von P-Selektin (1G1R) für die Docking-Studien von Fondaparinux und PPS zu bestätigen, war zu überprüfen, ob sowohl Agonisten als auch Antagonisten an die gleiche Bindetasche von P-Selektin binden. Da, wie schon erwähnt, keine Kristallstruktur von P-Selektin mit einem Antagonisten gefunden werden konnte, wurde ein Sequenz-Alignment mit der gefundenen Di-Domäne (1G1R) mit Hilfe des Programms BLAST durchgeführt [113], um ähnliche Proteine in der PDB-Datenbank zu finden, die mit einem Selektin-Antagonisten kokristallisiert sind. Das beste Ergebnis war hier eine Kristallstruktur bestehend aus Lektin/EGF Di-Domäne und zwei SCR-Domänen (nachfolgend als Tetra-Domäne bezeichnet), die eine strukturelle Übereinstimmung von 62 % mit der Di-Domäne (1G1R) hatte. Die gefundene Tetra-Domäne ist eine Teilstruktur von E-Selektin, das mit einem Glycomimetikum als seinem Antagonisten kokristallisiert wurde (PDB-Code: 4C16) [114–116]. Die N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc)-Mimik [117] übt eine antagonistische Wirkung auf E-Selektin mit einer Affinität von  $K_D = 19 \mu\text{M}$  aus [118]. Eine sehr wichtige Voraussetzung für die richtige Durchführung der Docking-Studien war festzustellen, ob der Agonist, Sialyl-Lewis-x und der Antagonist, N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc)-Mimik an die gleiche Bindetasche gebunden werden. Dazu wurden die Kristallstrukturen der Di- und Tetra-Domänen (1G1R und 4C16) in MOE 2013.08 [119] hochgeladen und überlagert (siehe Abbildung 8-6).



8-6 Strukturüberlagerung von Lektin/EGF-Domänen (Di-Domäne) von P-Selektin (1G1R), rosa dargestellt, und Lektin/EGF und zwei SCR-Domänen (Tetra-Domäne) von E-Selektin (4C16), grau dargestellt.

Darüber hinaus war von großer Bedeutung, die richtigen Einstellungen (z.B. Docking-Protokoll und Methode zur Platzierung) für vernünftige Docking-Studien von Fondaparinux und PPS ableiten zu können. Zu diesem Zweck wurde ein sogenanntes „Re-Docking“ durchgeführt. Das heißt, dass versucht wurde, das Glycomimetikum, N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc)-Mimik, durch variierende Docking-Einstellungen nochmal in dieselbe Bindetasche an der Tetra-Domäne (4C16) zu docken. Die strukturelle Übereinstimmung zwischen dem kokristallisierten Antagonisten und dem durch das Redocking gefundene Pose des Antagonisten wurde durch die Standardabweichung („Root Mean Square Deviation“ (RMSD)) in Å bestimmt. Je kleiner die RMSD-Werte sind, desto wahrscheinlicher ist es, dass die ausgewählten Einstellungen bei den eigentlichen Docking-Studien realitätsnahe Ergebnisse liefern.

Die komplexe Vorbereitung und das Redocking wurden mit Hilfe von MOE 2013.08 [119] durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden vorgenommen: Amber 10: EHT wurde als Kraftfeld ausgewählt und das Lösungsmittelmodell wurde auf den Reaktionsfeldmodus gesetzt. Die Kristallstruktur der Tetra-Domäne des E-Selektins (4C16) wurde als Protein definiert, während das kokristallisierte Glycomimetikum als Ligand diente. Das Protein wurde in MOE hochgeladen und die Wassermoleküle wurden entfernt. Strukturelle Probleme wurden korrigiert und die Protonierung an die zuvor beschriebenen

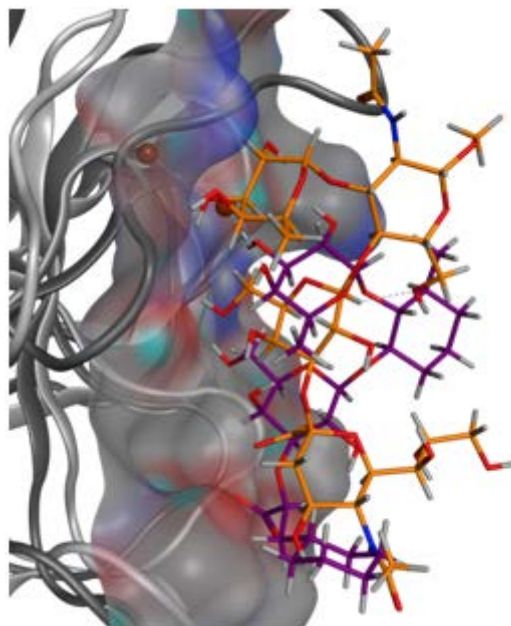
kapillarelektrophoretische Untersuchungsbedingungen angepasst ( $T [K] = 296,5$ ,  $pH = 7,4$ , Salzkonzentration  $[mol / l] = 0,1$ ). Zwei Docking-Protokolle „Rigid Receptor“ und „Induced Fit“ wurden nacheinander ausgeführt. Das Rigid Receptor Docking-Protokoll hält das Protein während des Dockings starr, während das Induced Fit Docking-Protokoll die Bindungstasche des Proteins als flexibel betrachtet. Der „Triangle Matcher“ diente als Platzierungsmethode für den Liganden in die Bindetasche des Proteins. Die erhaltenen Posen wurden zunächst mit der „Scoring-Funktion ASE“ (ASE = Alpha Sphere und Exclusion Sphere Ligand-Protein Docking) bewertet. Danach wurde eine Verfeinerung der Posen auf Basis des Amber 10: EHT-Kraftfeldes durchgeführt. Die hierbei erhaltenen „Scores“ werden in kcal / mol angegeben und sind ein Maß für die potentielle Energie des Liganden. Je niedriger eine score, desto günstiger ist die entsprechende Pose. Die beim Redocking erhaltenen Posen wurden in einer Molecular Database Datei (.mdb) gespeichert. Der RMSD-Wert zwischen jeder Redocking-Pose und der ursprünglichen Liganden Position aus der Kristallstruktur wurde beurteilt und ausgewertet.

Die optimalen Einstellungen des Redockings wurden anschließend auf die Docking-Studien übertragen. Die Kristallstruktur der Di-Domäne von P-Selektin (PDB-Code 1G1R) diente als Protein, während Fondaparinux und PPS als Liganden zum Docking verwendet wurden. Alle Docking-Studien wurden mit Hilfe von MOE 2013.08 [119] durchgeführt. Die Liganden Fondaparinux und PPS wurden in MOE hochgeladen und energieminiert. Darüber hinaus wurden Konformere der beiden Liganden erzeugt und als .mdb gespeichert. Die Docking-Studien wurde mit dem Rigid Receptor Docking-Protokoll durchgeführt, da dieses Protokoll zuvor die besten Ergebnisse erzielte. Alle Konformere von beiden Liganden wurden mit und ohne Berücksichtigung des Calcium-Ions gedockt. Zusätzlich wurde ein Docking auf der Proteinoberfläche durchgeführt. Dieser Schritt wurde ausgeführt, um zu überprüfen, ob die Liganden möglicherweise nicht nur in der Bindetasche, sondern zusätzlich auch auf der Oberfläche des Proteins gebunden werden können. Alle Posen wurden hinsichtlich ihrer Bindungsmodi und ihrer entsprechenden Scores beurteilt. Um den Einfluss der Calcium-Ionen auf die Konformation des Proteins zu ermitteln, wurde vor und nach der Entfernung aller Calcium-Ionen eine

Energieminimierung durchgeführt und die erhaltenen Konformationen wurden mit MOE 2013.08 [119] überlagert.

### 8.3.2 Ergebnisse

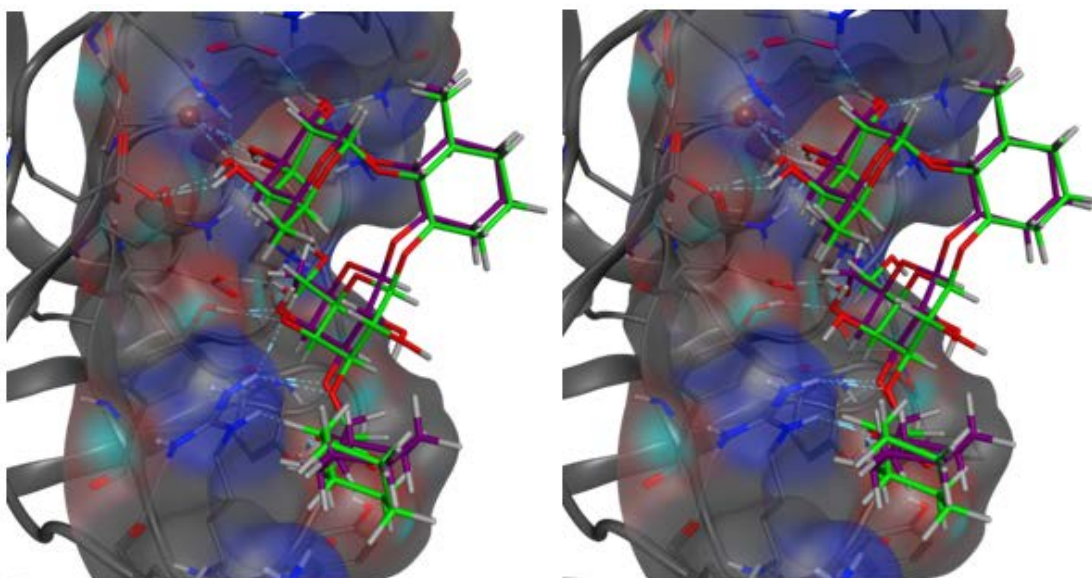
Die Bindetaschen aus der strukturellen Überlagerung der Kristallstruktur der Di-Domäne von P-Selektin (PDB-Code 1G1R, hellgrau) und der Kristallstruktur der Tetra-Domäne des E-Selektins (PDB-Code 4C16, dunkelgrau) sind in der Abbildung 8-7 dargestellt. Wie aus dieser Abbildung eindeutig zu erkennen ist, bindet das Glycomimetikum (in Abbildung 8-7 lila dargestellt) als Antagonist an der gleichen Stelle der Selektine, wie Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (in Abbildung 8-7 orange dargestellt) als Agonist. Durch diese Überlagerung kann gezeigt werden, dass Agonisten und Antagonisten identische Bindungsorte an den zuständigen Domänen der Selektine aufweisen. Aus diesem Grund konnte die Di-Domäne von P-Selektin (PDB-Code 1G1R) für die weiteren Docking-Untersuchungen von Fondaparinux und PPS verwendet werden.



8-7 Strukturelle Überlagerung von den Bindetaschen der Kristallstrukturen der Di-Domäne von P-Selektin (PDB-Code 1G1R, hellgrau) und der Kristallstruktur der Tetra-Domäne des E-Selektins (PDB-Code 4C16, dunkelgrau), Glycomimetikum als Antagonist (lila) und Sialyl-Lewis-x als Agonist (orange).

Für die Durchführung der Docking-Studie wurde, wie schon erwähnt, ein sogenanntes Redocking im Vorfeld durchgeführt. Dazu wurden zwei Docking-Protokolle „Rigid Receptor“ und „Induced Fit“ verwendet (siehe Abschnitt 8.3.1). Jede Redocking-Pose aus den beiden Protokollen wurde dann mit dem

ursprünglichen Liganden aus der Kristallstruktur der Tetra-Domäne des E-Selektins (PDB-Code 4C16) verglichen, die RMSD-Werte ermittelt und ausgewertet. Die Abbildung 8-8 zeigt die Redocking-Posen mit dem niedrigsten RMSD-Wert aus dem Rigid Receptor Protokoll (RMSD = 0,7155 Å, links in der Abbildung) und dem Induced Fit Protokoll (RMSD = 0,7586 Å, rechts in der Abbildung). Die Liganden aus den beiden Docking-Protokollen (in der Abbildung 8-8 grün dargestellt) reproduzieren zum großen Teil die ursprüngliche Liganden-Pose (in der Abbildung 8-8 lila dargestellt) aus der Kristallstruktur. Da das Docking-Protokoll Rigid Receptor den kleineren RMSD-Wert lieferte, wurde dieses Protokoll für die nachfolgenden Docking-Studien verwendet.

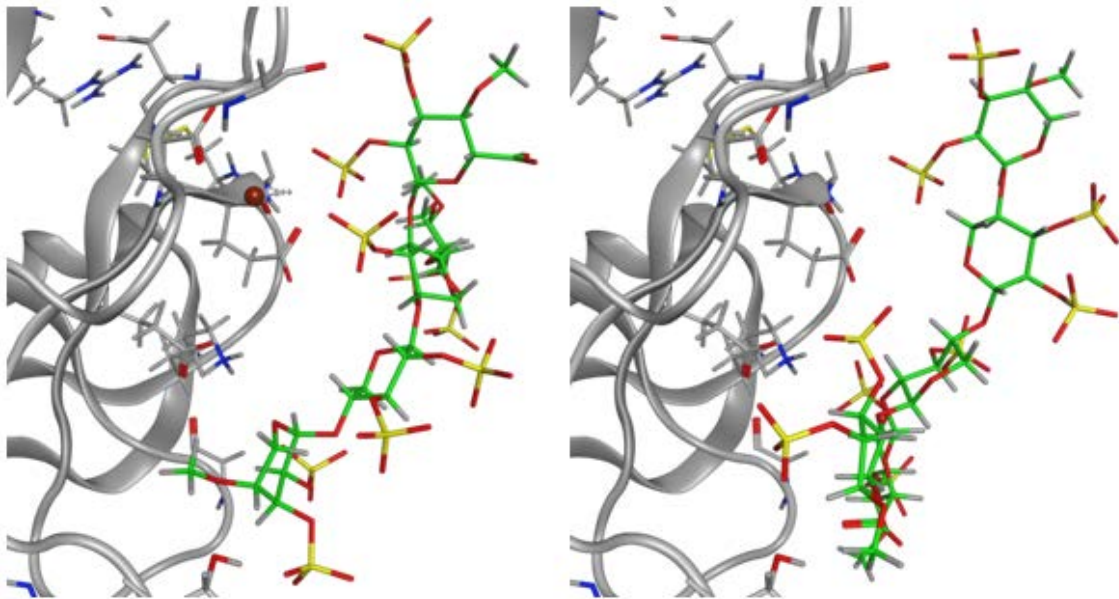


8-8 Die Redocking-Posen mit dem niedrigsten RMSD-Wert aus dem Rigid Receptor Docking (links), und aus dem Induced Fit Docking (rechts); Liganden aus den beiden Docking-Protokollen (grün), Liganden aus der ursprünglichen Kristallstruktur (lila).

Mit den Erkenntnissen aus den Redocking-Untersuchungen wurden die Docking-Studien mit Fondaparinux und PPS an die Di-Domäne von P-Selektin (PDB-Code 1G1R) durchgeführt. Abbildung 8-9 zeigt die besten gedockten Posen von PPS, auf der einen Seite unter Berücksichtigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (links in der Abbildung 8-9), und auf der anderen Seite in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (rechts in der Abbildung 8-9). Bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nimmt das PPs eine Konformation ein, bei dem zwei Sulfatreste mit dem Erdalkali-Ion wechselwirken können. Dadurch nimmt die Stärke der Interaktion zwischen dem PPS und der Di-Domäne von P-Selektin zu, was in einem etwas

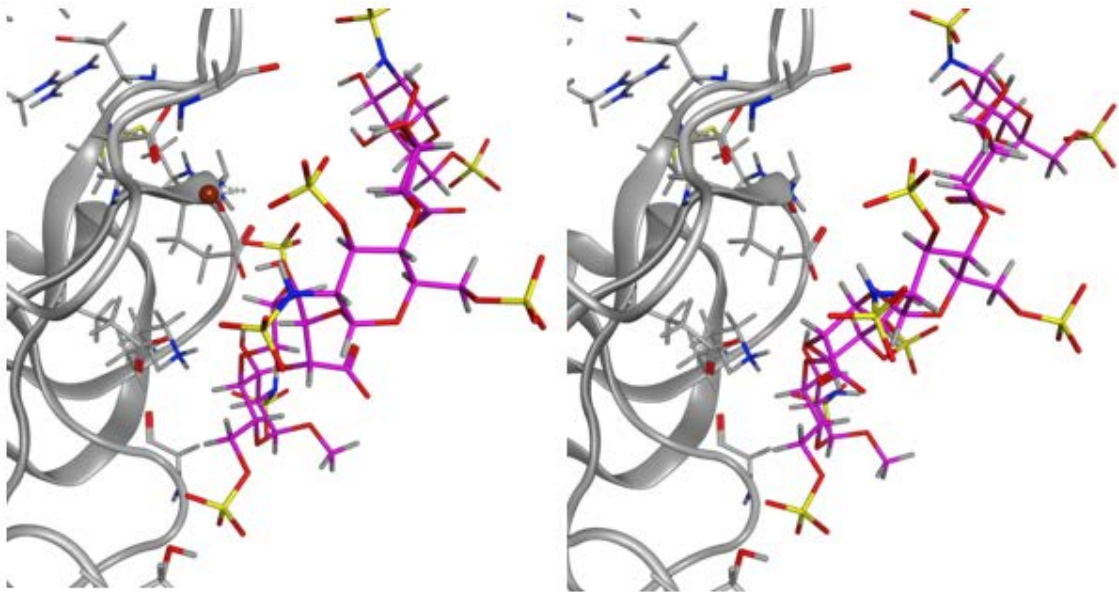


besseren Score zum Ausdruck kommt ( $-11,2849$  kcal/mol mit  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $-10,7133$  kcal/mol ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ).



8-9 Die besten gedockten Posen von PPS an die Di-Domäne von P-Selektin in Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

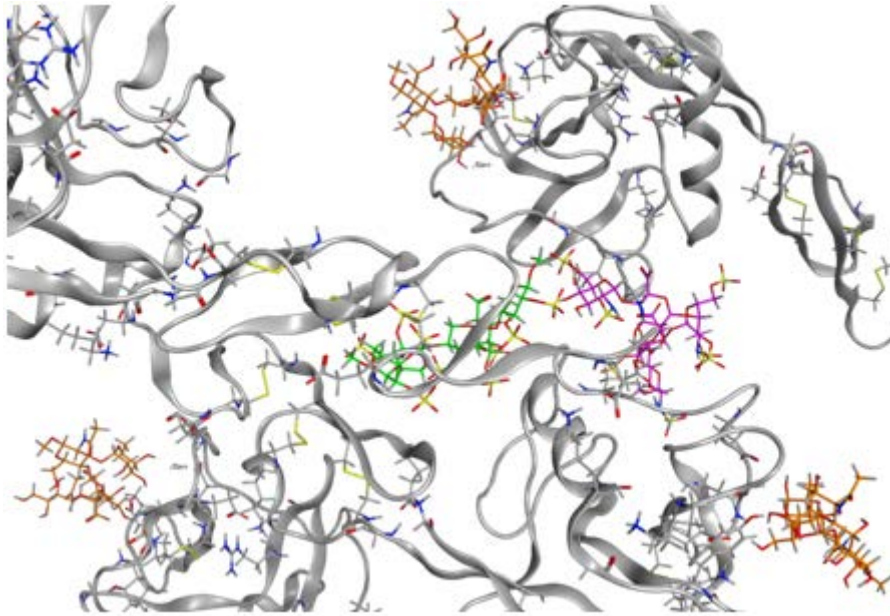
Die gleichen Docking-Untersuchungen wurden anschließend mit Fondaparinux als Ligand durchgeführt. Die besten ausgewerteten Posen von Fondaparinux in Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind in der Abbildung 8-10 dargestellt. Analog zu PPS nimmt Fondaparinux auch hier eine Konformation ein, bei der zwei Sulfatreste mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion interagieren. Entsprechend ergibt sich auch in diesem Fall bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ein besserer Score als bei Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.



8-10 Die besten gedockten Posen von Fondaparinux an die Di-Domäne von P-Selektin in Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

Um mögliche andere Bindungsstellen für Fondaparinux bzw. PPS an P-Selektin zu finden, wurden die beiden Liganden abschließend in einem sogenannten Blind-Docking Ansatz untersucht. Hierbei wurde die Oberfläche der Kristallstruktur der Di-Domäne von P-Selektin (PDB-Code 1G1R), unter Ausschluss der vorher identifizierten Bindetaschen, als Suchgebiet definiert. Abbildung 8-11 zeigt die energetisch günstigsten gedockten Posen von Fondaparinux (lila) und PPS (grün). Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass beide Liganden, Fondaparinux und PPS, in einiger Entfernung von den definierten Bindetaschen (auf der Abbildung erkennbar durch Sialyl-Lewis-x in orange) auf der Oberfläche von der Di-Domäne gedockt werden. Dabei ist anzumerken, dass sowohl die Docking-Pose von Fondaparinux (-14,656 kcal/mol) als auch von PPS (-13,998 kcal/mol) bessere Scores geliefert haben als bei den Docking-Studien, bei denen nur eine definierte Bindetasche als Dockingort festgelegt wurde.

An dieser Stelle ist wichtig zu erwähnen, dass diese Bindestellen, die auf der Oberfläche von der Di-Domäne gefunden wurden, nicht als endgültig bestätigte Bindetaschen von den Heparinoiden auf P-Selektin betrachtet werden dürfen. Vielmehr handelt es sich hier zunächst um Vorversuche, die zwar weiterer Bestätigung bedürfen aber doch die Vermutung nahelegen, dass es mehr als eine Bindestelle für Heparinoide auf P-Selektin gibt (siehe Abschnitt 8.2).



8-11 Die besten gedockten Posen von Fondaparinux (lila) und PPS (grün) auf der Oberfläche der Kristallstruktur der Di-Domäne von P-Selektin (1G1R).

#### 8.4 Zusammenfassung

Die durchgeführten affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchungen der Heparinoide und P-Selektin haben gezeigt, dass Affinitätskapillarelektrophorese auf der einen Seite zur Ermittlung der Stärke der Interaktionen, und auf der anderen Seite zur Bestimmung der halbmaximalen Konzentration der Wechselwirkungen eingesetzt werden kann. Somit konnte eine halbmaximale Konzentration der Heparinoide von 3 mg/l ermittelt werden. Allerdings war das Ausmaß der Wechselwirkungen zwischen den Heparinoiden und dem P-Selektin auf Grund der Größe des P-Selektins, und der dementsprechend geringen Änderung des Ladung-Masse-Verhältnisses nicht stark ausgeprägt. Desweiteren konnte durch diese Untersuchungen eindeutig gezeigt werden, dass Calcium-Ionen einen entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkungen von Heparinoiden mit dem P-Selektin haben.

Die Computermodele und die Docking-Studien haben den Einfluss von Calcium-Ionen auf die Wechselwirkungen zwischen Heparinoiden und P-Selektin bestätigt.

Außerdem konnten die Docking-Studien bestätigen, dass für die Heparinoide mit mehr als einer Bindestelle auf dem P-Selektin gerechnet werden muss. Diese Feststellung korrespondiert mit den affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchungen, die gegen eine 1:1 Bindungsstöchiometrie sprechen und eine kooperative Bindung nahelegen.

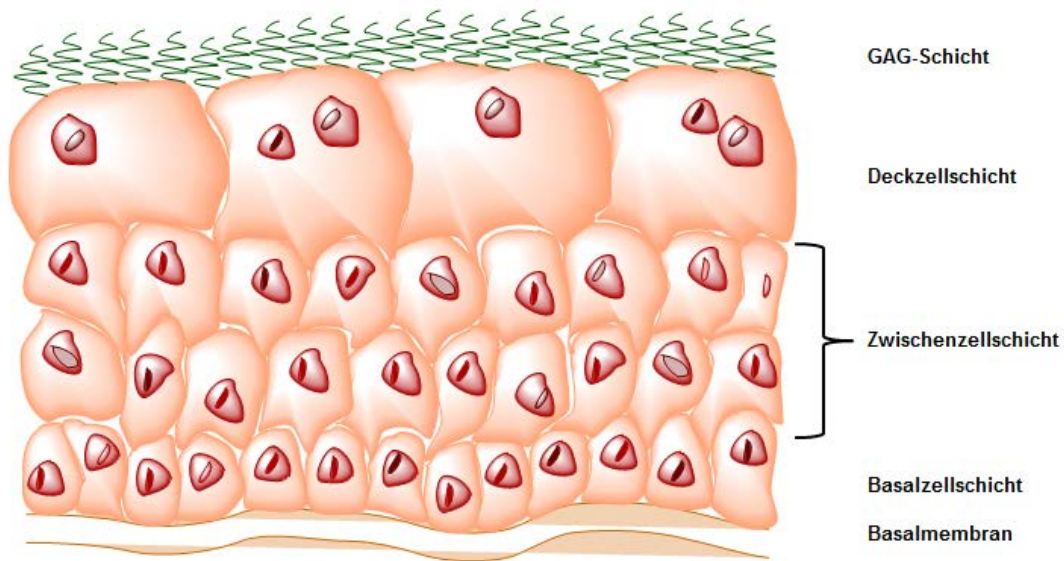
Abschließend ist erwähnenswert, dass ähnlich wie bei den vorangegangenen Protein-Heparinoid-Untersuchungen geringe Unterschiede im Bindungsverhalten der verschiedenen Heparinoide festgestellt werden konnten, obwohl alle Heparinoide eine ähnliche chemische Struktur aufweisen.

## **9 Untersuchung der Wechselwirkungen von toxischen Urinsubstanzen mit Heparinoiden**

### **9.1 Einführung: Urothel und Interstitielle Zystitis**

Interstitielle Zystitis (*interstitial cystitis IC*), auch häufig schmerzhaftes Blasensyndrom (*painful bladder syndrome; PBS*) genannt, ist ein Sammelbegriff für ein urologisches Krankheitsbild, welches mit den typischen Symptomen, wie Harndrang, häufigem Wasserlassen und brennenden Schmerzen einhergeht [120–122]. Dabei handelt es sich um eine chronische Entzündung der Harnwege ohne den Nachweis einer bakteriellen Infektion. Der Verlauf dieser Entzündung ist schwer vorherzusagen und geschieht meistens in Schüben. Diese Erkrankung tritt bei den Frauen häufiger als bei den Männern auf, und ist sehr schwer diagnostizierbar [120,123]. In der Medizin ist über viele Jahren, je nach genauen Symptomen, zwischen IC und PBS unterschieden worden. Aber aufgrund der Vielfältigkeit der Symptome, und der Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen IC und PBS in der Diagnose, verwendet die Internationale Kontinenzgesellschaft (ICS) einen kombinierten Begriff „IC / PBS“ bzw. „PBS / IC“ als Standardisierung der Terminologie für Symptome der unteren Harnwege [121,124].

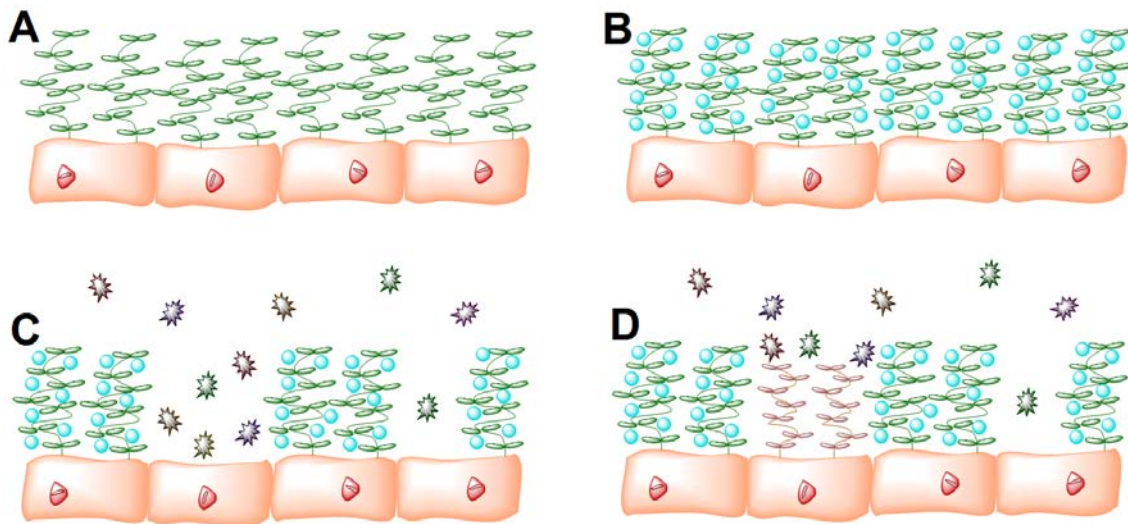
Bei der IC / PBS geht man davon aus, dass die schützende Schleimschicht (Glykosaminoglykan(GAG)-Schicht), die sich auf der Deckzellschicht des Blasenepithels [125,126] (Urothel) befindet, geschädigt ist [120,123] (siehe Abbildung 9-1). Dabei können die toxischen und irritierenden Substanzen, die sich im Urin befinden, in direkten Kontakt mit der Blasenwand kommen, sie durchdringen und die typischen Symptome dieser Erkrankung auslösen [121,127]. Die Schmerzen entstehen einerseits durch die Depolarisation der Muskeln und Nerven, und andererseits durch die Freisetzung der inflammatorischen Mediatoren von den Mastzellen [123,128].



9-1 Schematische Darstellung von dem Aufbau des Blasenepithels (Urothel). Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [125,126].

Der Grund, weshalb es zu einer Schädigung der GAG-Schicht kommt, ist noch unklar. Die GAG-Schicht besteht aus sulfatierten Polysacchariden, die sehr polar (hoch negativ geladen) und sehr hydrophil sind [127]. Diese Eigenschaften von GAG führen dazu, dass GAG Wassermoleküle aus dem Urin mit höherer Affinität als andere Kationen binden. Dadurch werden die Wassermoleküle in der GAG-Schicht gefangen und das Ganze bildet eine undurchlässige physikalische Barriere gegen gelöste Ionen, die sich im Urin befinden, und schützt somit die Blasenwand und die untere Zellschichten vor den schädigenden Urinsubstanzen [127] (siehe Abbildung 9-2 B). Bestimmte Kationen, wie quartäre Amine haben ebenfalls eine sehr hohe Affinität zu den sulfatierten Polysacchariden und können mit der GAG-Schicht interagieren [120], Wassermoleküle ersetzen und diese Schicht dadurch zerstören [127] (siehe Abbildung 9-2 C). Man nimmt an, dass durch die Gabe von Heparin und heparinähnlichen Substanzen, wie PPS [17] die geschädigte GAG-Schicht zum Teil regeneriert werden kann und die Barriere wieder hergestellt wird (siehe Abbildung 9-2 D). Aus diesem Grund kommen Heparinoide u. a. in der Therapie von IC / PBS häufig zum Einsatz [123,128].





9-2 Schematische Darstellung der GAG-Barriere; **A:** GAG-Schicht ohne gebundene Wassermoleküle, **B:** GAG-Schicht mit den gebundenen Wassermolekülen, **C:** Zerstörung der GAG-Schicht durch die für diese Schicht toxischen Urinsubstanzen, **D:** Regeneration der GAG-Schicht durch die Gabe von Heparinoiden.  
Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [17,127].

Eine Gruppe der kationischen Substanzen, die sich im Urin befinden, sind Metabolite der Nukleoside, die als kationische Fraktionen im Urin bezeichnet werden. Parsons et al. haben bei einer Untersuchung diese Substanzen aus dem Urin von Patienten mit IC / PBS und dem gesunden Probanden isoliert und identifiziert. Dabei wurde festgestellt, dass im Vergleich zu gesunden Probanden im Urin der Patienten mit IC / PBS höhere Mengen von Nukleosidmetaboliten zu finden waren [129].

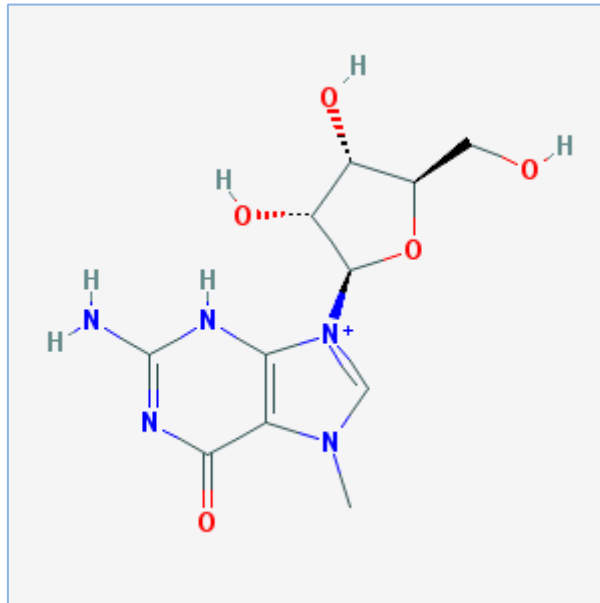
Bei den Metaboliten der Nukleinsäuren handelt es sich meistens um methylierte Nukleoside. In dieser Arbeit wurden zwei Nukleosidmetabolite auf ihre Wechselwirkung mit Heparinoiden mittels der ACE untersucht (siehe Abschnitt 9.2 – 9.4).

## 9.2 Untersuchte Substanzen

### 9.2.1 N<sup>7</sup>-Methylguanosin

N<sup>7</sup>- Methylguanosin ist ein modifiziertes Purinnukleosid (siehe Abbildung 9-3). Dabei ist die Base Guanosin an der Position N7 methyliert und besitzt eine positive Ladung. Parsons et al. haben festgestellt, dass dieser Metabolit eine Zytotoxizität von 20 % aufweist, und im Urin der Patienten mit IC / PBS vermehrt zu finden ist [129]. Zur Ermittlung der Zytotoxizität wurden die

isolierten kationischen Fraktionen auf kultivierte Urothelzellen gegeben, wodurch das Ausmaß der Toxizität dieser Fraktionen ermittelt wurde [129].

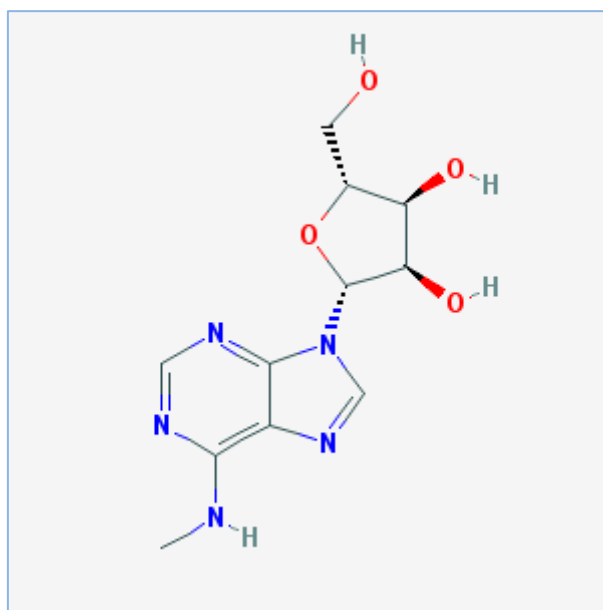


9-3 Struktur von N<sup>7</sup>- Methylguanosin (Quelle: Pubchem, Open Chemistry Database, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7-methylguanosine#section=Top>).

### 9.2.2 N<sup>6</sup>-Methyladenosin

N<sup>6</sup>-Methyladenosin ist, ähnlich der Substanz N<sup>7</sup>- Methylguanosin, ebenfalls ein modifiziertes Purinnukleosid (siehe Abbildung 9-4). Bei diesem Metaboliten hat eine Methylierung an der Position N6 stattgefunden. N<sup>6</sup>-Methyladenosin besitzt bei dem pH-Wert von 7,4 keine Ladung. Die Zytotoxizität von Methyladenosin wurde von Parsons et al. auf etwa 51 % geschätzt (beschrieben als 1-Methyladenosin in seiner Arbeit). Auch dieser Metabolit wurde bei den Patienten mit IC / PBS vermehrt im Urin gefunden [129].





9-4 Struktur von N<sup>6</sup>-Methyladenosin (Quelle: Pubchem, Open Chemistry Database, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/102175#section=Top>).

### 9.3 Versuchsaufbau und Ziele

Die beiden Substanzen N<sup>7</sup>- Methylguanosin und N<sup>6</sup>-Methyladenosin wurden mittels einer affinitätskapillarelektrophoretischen Methode (siehe Abschnitt 11.3.6) auf ihre Wechselwirkungen mit Heparin und PPS untersucht. Dabei wurden zwei Versuchsanordnungen zugrunde gelegt. N<sup>7</sup>- Methylguanosin wurde aufgrund des Vorhandenseins einer positiven Ladung bei pH 7,4 direkt auf die Interaktionen mit den Heparinoiden untersucht. Da N<sup>6</sup>-Methyladenosin bei pH 7,4 keine Ladung trägt, würde bei dem Elektropherogramm der Peak von N<sup>6</sup>-Methyladenosin genau auf das Signal des EOF-Markers fallen und nicht auswertbar werden. Aus diesem Grund wurden bei N<sup>6</sup>-Methyladenosin indirekte Messungen mit Hilfe von HSA als Hilfsprotein durchgeführt, und die Peaks von HSA für die Auswertung der Ergebnisse als Bezugspeak genommen. Da die Interaktionen von HSA mit den Heparinoiden bekannt waren (siehe Abschnitt 6), konnte durch die Zugabe von N<sup>6</sup>-Methyladenosin indirekt festgestellt werden, welchen Einfluss N<sup>6</sup>-Methyladenosin auf die Wechselwirkungen hat, und wie stark es mit den Heparinoiden in Wechselwirkung tritt. Es wurden zwei Inkubationen vorgenommen, nämlich die Inkubation von N<sup>6</sup>-Methyladenosin in HSA und die Inkubation von N<sup>6</sup>-Methyladenosin in die jeweiligen Liganden (siehe Abschnitt 11.3.6). Für die Durchführung der indirekten Messungen wurden im ersten Schritt die Interaktionen von reinem HSA mit Heparin und

PPS in jeweils 9 verschiedene Konzentrationen, nämlich 1 mg/l, 3 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l und 1500 mg/l untersucht. Danach wurde eine Mischung aus HSA und N<sup>6</sup>-Methyladenosin als Probe genommen und die Wechselwirkungen dieser Mischung mit Heparin und PPS in ebenfalls jeweils 9 obengenannten Konzentrationen gemessen. Im letzten Schritt wurde N<sup>6</sup>-Methyladenosin in die jeweiligen Stammlösungen von Heparin und PPS gegeben, sodass diese Stammlösungen jeweils eine Endkonzentration von 2 g/l von dem jeweiligen Heparinoid und N<sup>6</sup>-Methyladenosin erreichten. Danach wurden die Stammlösungen in die obengenannten 9 Konzentrationen weiterverdünnt und die Wechselwirkungen davon mit reinem HSA untersucht. Somit konnte festgestellt werden, wie sich die jeweiligen Inkubationen auf die Wechselwirkungen auswirken.

Ziel dieser Versuchsreihen war, festzustellen, ob und wie stark die Heparinoide mit den toxischen Urinsubstanzen interagieren. Für den Fall einer tatsächlich nachweisbaren Wechselwirkung sollten die toxischen Urinsubstanzen durch diese Interaktionen von den Heparinoiden neutralisiert werden, bevor sie in Kontakt mit der GAG-Schicht kommen und sie beschädigen.

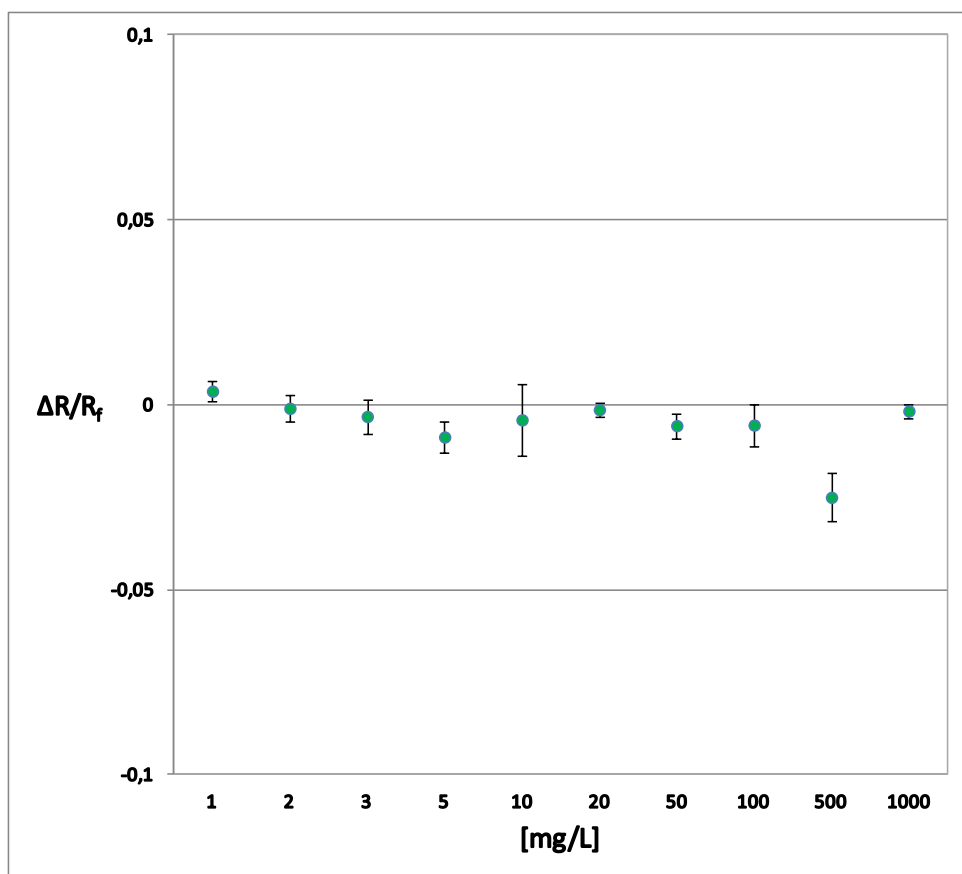
## **9.4 Ergebnisse**

### **9.4.1 N<sup>7</sup>-Methylguanosin**

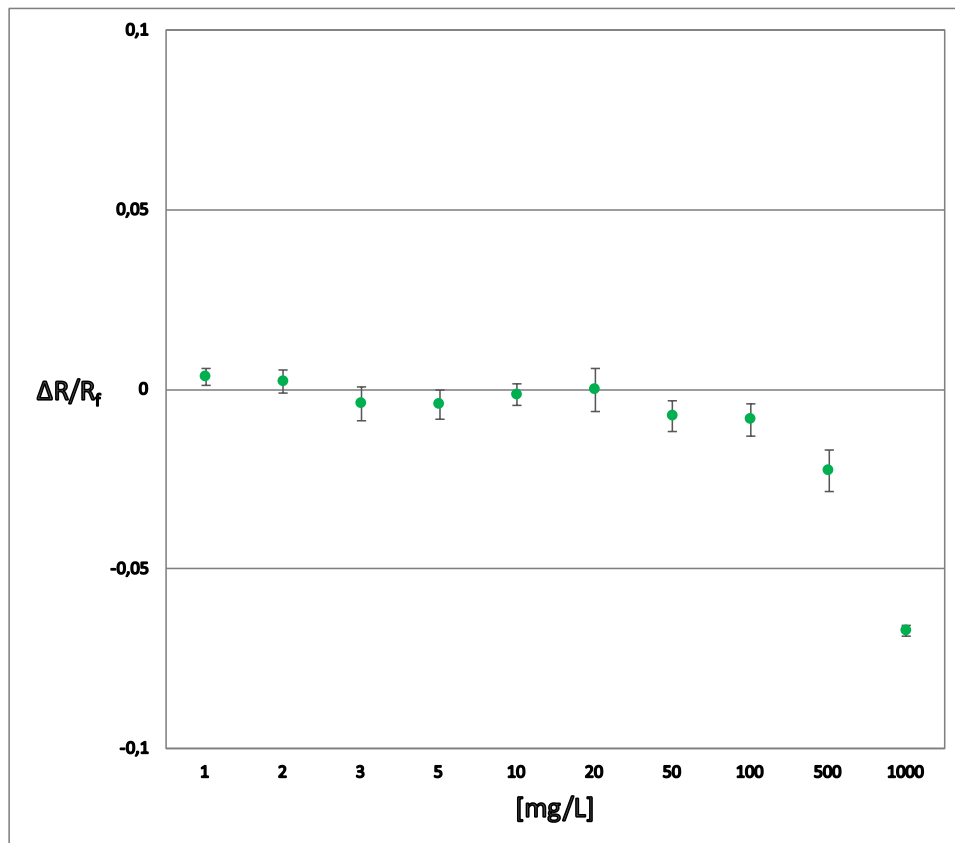
Für die direkte Messung der Interaktionen von N<sup>7</sup>- Methylguanosin mit den Heparinoiden wurden zuerst acht verschiedene Konzentrationen, nämlich 1 mg/l, 3 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l von dem jeweiligen Heparinoid verwendet. Die Probelösung von N<sup>7</sup>- Methylguanosin wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt.

Abbildung 9-5 zeigt das Interaktionsdiagramm von N<sup>7</sup>- Methylguanosin mit Heparin, und die Abbildung 9-6 stellt das Interaktionsdiagramm von N<sup>7</sup>-Methylguanosin mit PPS dar.

## Untersuchung der Wechselwirkungen von toxischen Urinsubstanzen mit Heparinoiden



9-5 Interaktionsdiagramm von N<sup>7</sup>- Methylguanosin mit Heparin.



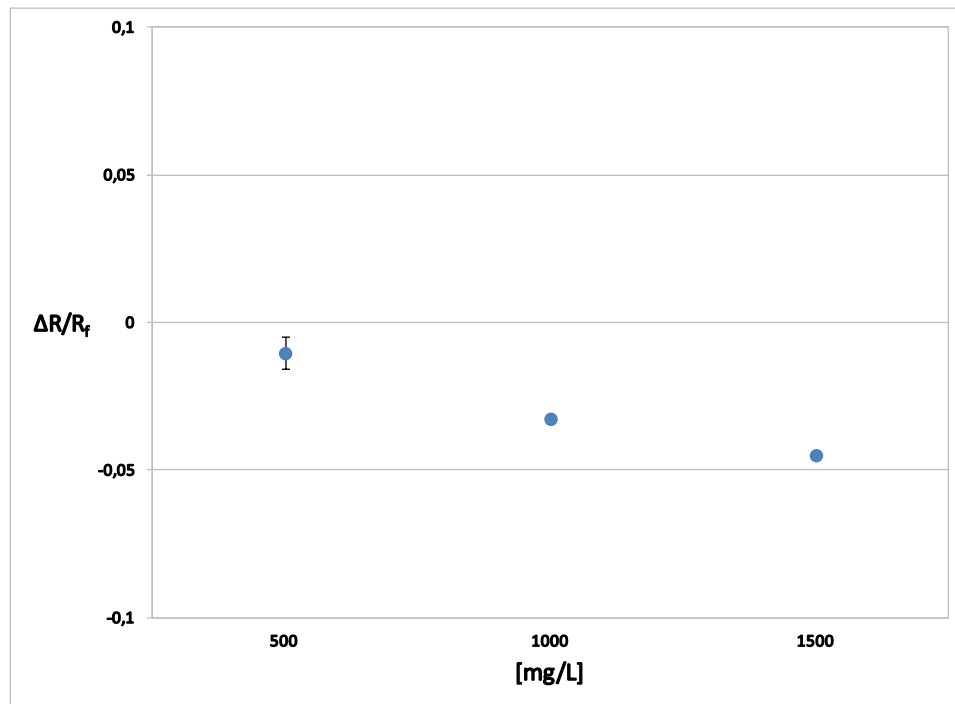
9-6 Interaktionsdiagramm von N<sup>7</sup>- Methylguanosin mit PPS.

Anhand dieser Interaktionsdiagramme ist festzustellen, dass es bei den niedrigeren Konzentrationen von Heparinoiden (1 mg/l – 100 mg/l) schwache Wechselwirkung mit N<sup>7</sup>- Methylguanosin gibt. Erst ab einer Konzentration von 500 mg/l ist eine starke Wechselwirkung erkennbar. Bei den Interaktionen von PPS mit N<sup>7</sup>- Methylguanosin wurde bei der Konzentration von 1000 mg/l eine weitere Verstärkung der Wechselwirkung beobachtet, was bei Heparin nicht der Fall war. Um einen Messfehler bei Heparin 1000 mg/l auszuschließen, wurden die Untersuchungen zum Teil wiederholt (500 mg/l und 1000 mg/l) und um eine zusätzliche Konzentration von 1500 mg/l erweitert.

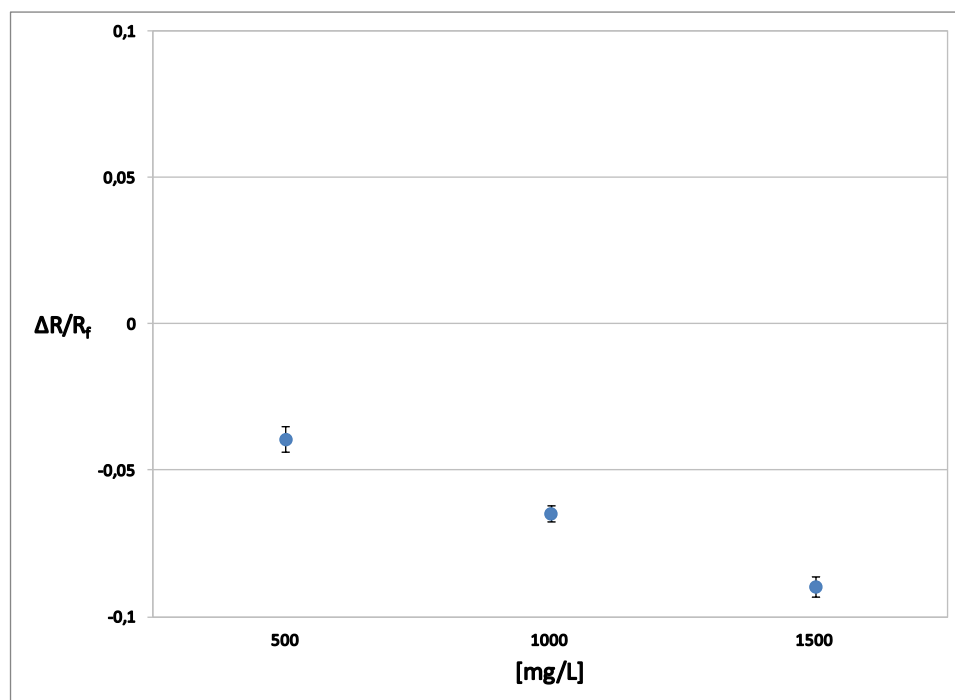
Abbildungen 9-7 und 9-8 zeigen die Interaktionsdiagramme von Heparin und PPS mit N<sup>7</sup>- Methylguanosin in den genannten Konzentrationen.

## Untersuchung der Wechselwirkungen von toxischen Urinsubstanzen mit Heparinoiden

---



9-7 Interaktionsdiagramm von N<sup>7</sup>- Methylguanosin mit Heparin in zwei wiederholten und einer zusätzlichen Konzentration.



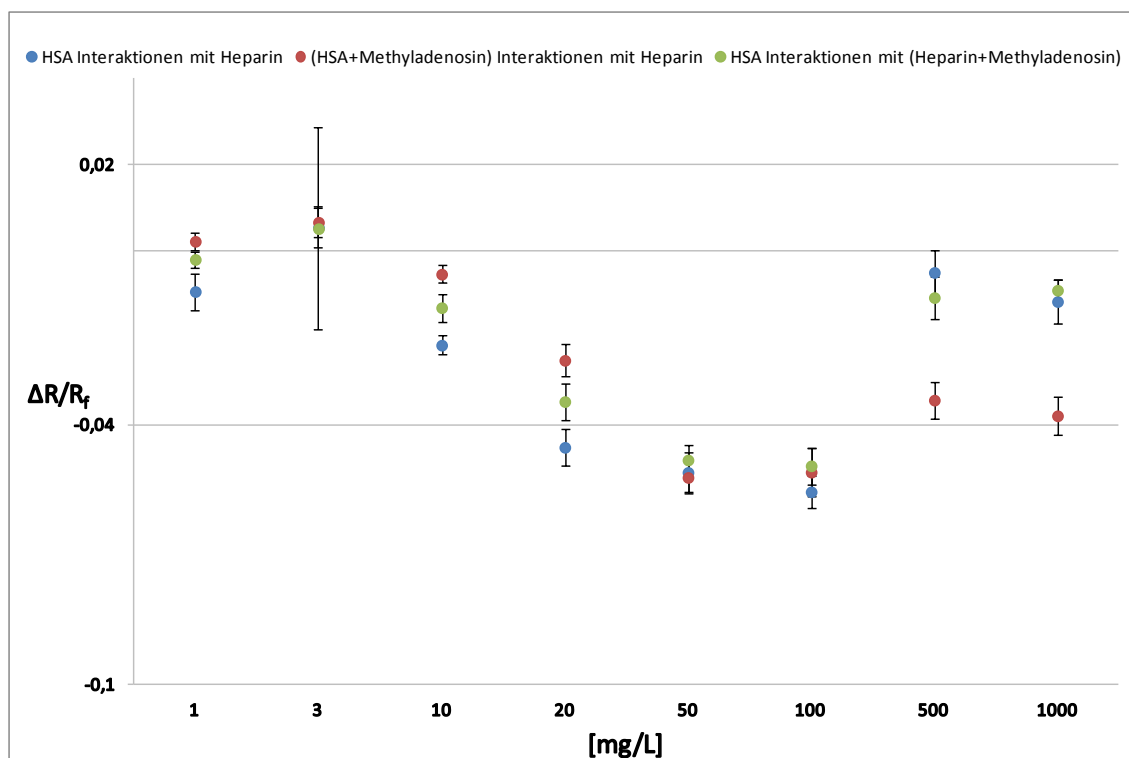
9-8 Interaktionsdiagramm von N<sup>7</sup>- Methylguanosin mit PPS in zwei wiederholten und einer zusätzlichen Konzentration.

Nach der Auswertung der Ergebnisse der Zusatzuntersuchungen konnte die Annahme belegt werden, dass es sich bei der ersten Messung von Heparin 1000 mg/l um einen Messfehler handelte. Der Trend, dass mit der Erhöhung der Heparinoid-Konzentration die Stärke der Wechselwirkung zunimmt,

bestätigte sich. Die beiden Heparinoide zeigen jeweils bei einer Konzentration von 1500 mg/l die stärkste Wechselwirkung mit N<sup>7</sup>-Methylguanosen.

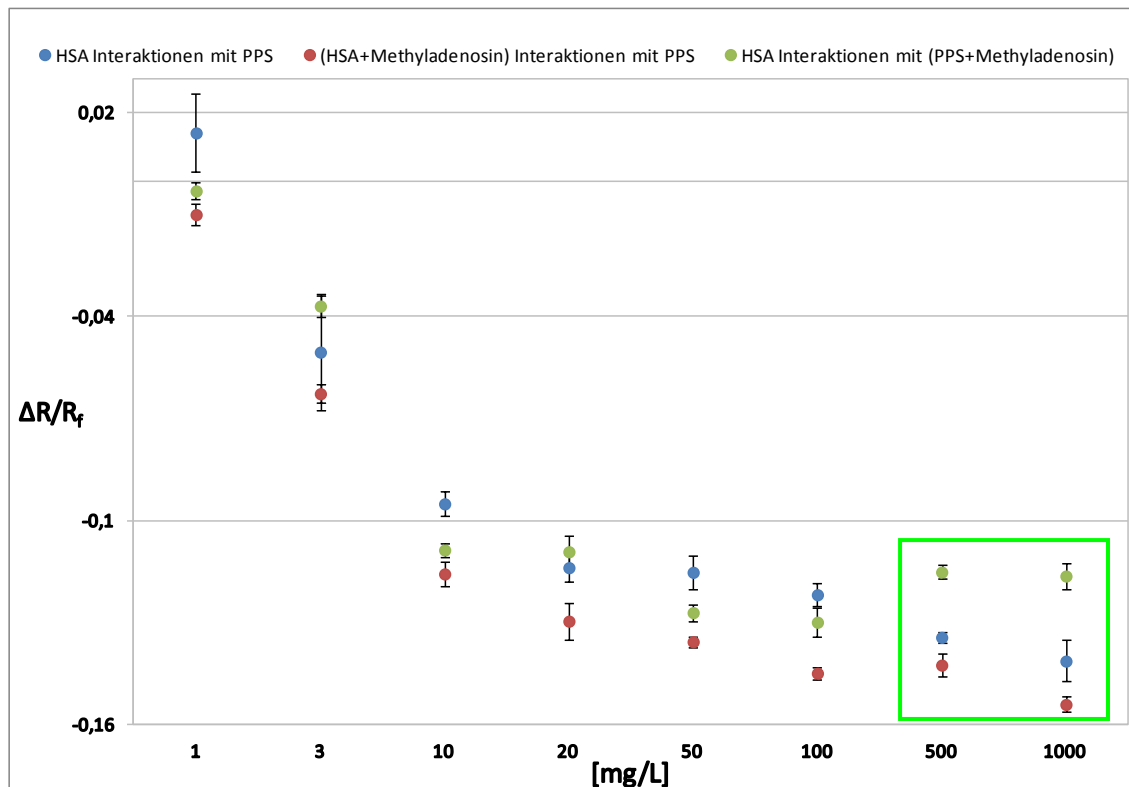
#### 9.4.2 N<sup>6</sup>-Methyladenosin

Für die indirekte Messung der Interaktionen von N<sup>6</sup>-Methyladenosin mit den Heparinoiden wurden ebenfalls zuerst acht verschiedene Konzentrationen, nämlich 1 mg/l, 3 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l von dem jeweiligen Heparinoid genommen. Für diese Untersuchungen wurden jeweils zuerst die Interaktionen von HSA mit der Verdünnungsreihe des jeweiligen Heparinoids gemessen. Danach wurden die Inkubationen durchgeführt und die Interaktionen der jeweiligen Inkubation untersucht (siehe Abschnitt 9.3). Abbildung 9-9 zeigt die Interaktionsdiagramme von HSA / N<sup>6</sup>-Methyladenosin mit Heparin, und die Abbildung 9-10 stellt die Interaktionsdiagramm von HSA / N<sup>6</sup>-Methyladenosin mit PPS dar (beides bezogen auf die erste Peak-Spezies von HSA).



9-9 Interaktionsdiagramm Heparin; Blau: Interaktionen von HSA mit Heparin, Rot: Interaktionen von (HSA + Methyladenosin) mit Heparin, Grün: Interaktionen von HSA mit (Heparin + Methyladenosin).

## Untersuchung der Wechselwirkungen von toxischen Urinsubstanzen mit Heparinoiden



9-10 Interaktionsdiagramm PPS; Blau: Interaktionen von HSA mit PPS, Rot: Interaktionen von (HSA + Methyladenosin) mit PPS, Grün: Interaktionen von HSA mit (PPS + Methyladenosin).

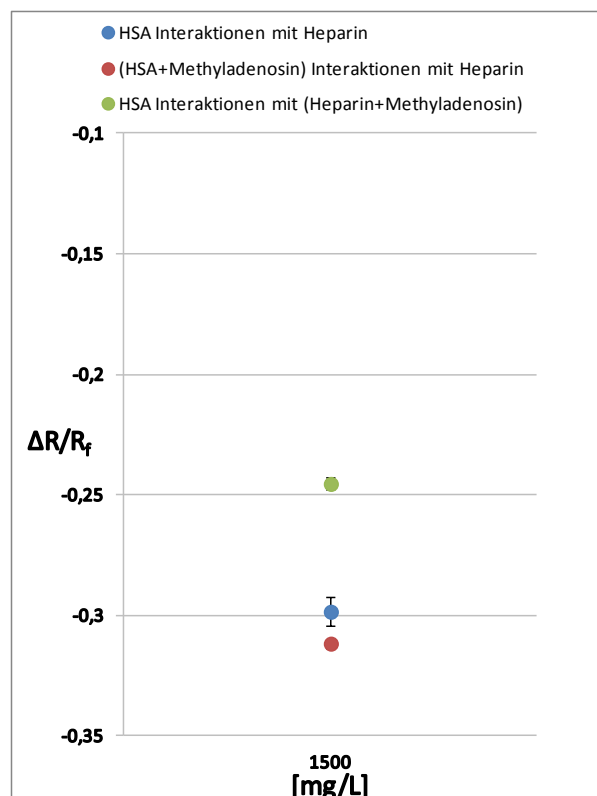
Die Abbildung 9-9 zeigt, dass bei den niedrigeren Konzentrationen von Heparin (1 mg/l – 100 mg/l) keine eindeutigen Unterschiede der Wechselwirkungen vor und nach der Inkubation zu erkennen sind. Die Inkubation von HSA mit N<sup>6</sup>-Methyladenosin verstärkte die Wechselwirkungen mit Heparin, die bei den höheren Konzentrationen von Heparin (500 mg/l und 1000 mg/l) erkennbar sind. Die Inkubation von N<sup>6</sup>-Methyladenosin mit Heparin zeigte jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Wechselwirkungen vor und nach der Inkubation.

Bei der Abbildung 9-10 kann man dahingegen ein klares Verhalten feststellen. Die Unterschiede der verschiedenen Inkubationen und deren Einflüsse auf die Wechselwirkungen, vor allem bei den höheren PPS Konzentrationen (500 mg/l und 1000 mg/l) sind in diesem Fall besser erkennbar. Ohne die Zugabe von N<sup>6</sup>-Methyladenosin gab es ziemlich starke Wechselwirkung von HSA mit PPS (blaue Punkte in dem Diagramm). Die Inkubation von HSA mit N<sup>6</sup>-

Methyladenosin führte zu einer Erhöhung der Affinität von PPS zu HSA (rote Punkte im Diagramm). Die Inkubation von PPS mit N<sup>6</sup>-Methyladenosin verringerte auf der anderen Seite die Stärke der Wechselwirkungen mit HSA (grüne Punkte im Diagramm). Dieses Ergebnis würde bedeuten, dass PPS das N<sup>6</sup>-Methyladenosin abgefangen hat und PPS demzufolge nicht in ausreichender Menge zur Interaktion mit HSA zur Verfügung stand. Dieses Verhalten konnte bei den höheren PPS Konzentrationen (500 mg/l und 1000 mg/l) eindeutig erkannt werden.

In einem weiteren Schritt wurde bei den Untersuchungen von N<sup>6</sup>-Methyladenosin auch eine höhere zusätzliche Konzentration von 1500 mg/l untersucht.

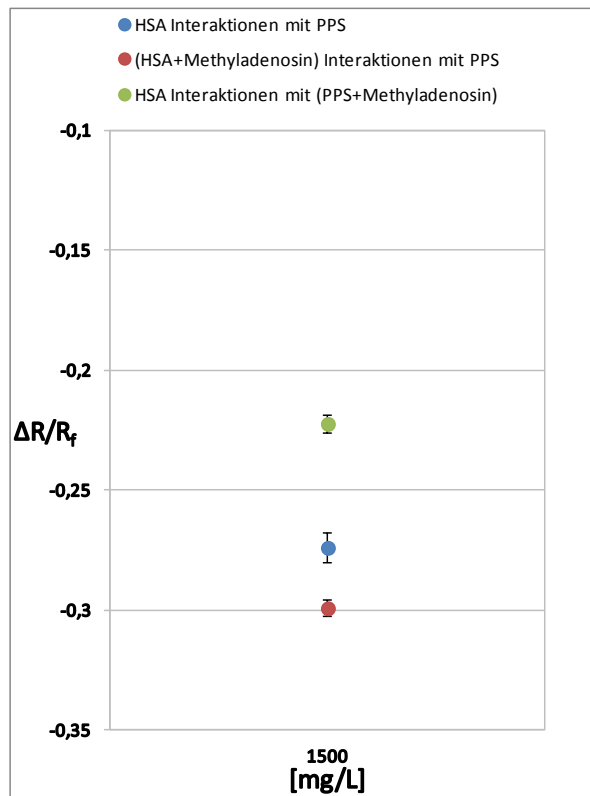
Abbildungen 9-11 und 9-12 zeigen die Interaktionsdiagramme von Heparin und PPS mit HSA / N<sup>6</sup>-Methyladenosin in der genannten Konzentration (beides bezogen diesmal auf die zweite Peak-Spezies von HSA).



9-11 Interaktionsdiagramm Heparin; Blau: Interaktionen von HSA mit Heparin, Rot: Interaktionen von (HSA + Methyladenosin) mit Heparin, Grün: Interaktionen von HSA mit (Heparin + Methyladenosin).



## Untersuchung der Wechselwirkungen von toxischen Urinsubstanzen mit Heparinoiden



9-12 Interaktionsdiagramm PPS; Blau: Interaktionen von HSA mit PPS, Rot: Interaktionen von (HSA + Methyladenosin) mit PPS, Grün: Interaktionen von HSA mit (PPS + Methyladenosin).

Die Abbildungen 9-11 und 9-12 zeigen, dass bei einer Heparinoid-Konzentration von 1500 mg/l ein ähnliches Bindungsverhalten zu erkennen war. Das bedeutet, dass die Inkubation von HSA mit N<sup>6</sup>-Methyladenosin zu einer Erhöhung der Wechselwirkungen mit den Heparinoiden geführt hat, dagegen führte eine Inkubation von N<sup>6</sup>-Methyladenosin mit dem jeweiligen Heparinoid zu einer Verringerung der Wechselwirkung mit HSA.

## **9.5 Zusammenfassung**

Die affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchungen der zwei toxischen Urinsubstanzen zeigten, dass die Heparinoide in der Lage sind, aufgrund einer Interaktion diese Substanzen im Urin abzufangen. Dieses Erkenntnis würde bedeuten, dass die Wirkung der Heparinoide nicht nur über die Regeneration der GAG-Schicht zu erklären wäre, sondern auch dadurch, dass sie die toxischen Substanzen im Urin abfangen und damit eine Schädigung der GAG-Schicht verhindern können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der eingesetzten Heparinoide von großer Bedeutung ist. Für eine effiziente Wirkung werden höhere ( $> 500 \text{ mg/l}$ ) Konzentrationen von Heparinoiden benötigt. Sowohl die direkten Messungen als auch die indirekten Messungen konnten diese Annahme bestätigen.

## 10 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass die Affinitätskapillarelektrophorese (ACE) eine Methode darstellt, die vom Grundsatz her sowohl für Bindungsstudien von kleinen Teilchen, wie Metallionen, als auch von großen Molekülen, wie Polysacchariden, geeignet ist. Für die Gewinnung signifikanter Ergebnisse ist jedoch entscheidend, dass die Methode auf das jeweilige Trennproblem spezifisch angepasst wird. Für die Untersuchung von Metallionen, die eine starke Neigung dazu haben, an der Kapillarwand zu adsorbieren ( $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen) hat sich die Anwendung einer EDTA-haltigen Natronlauge-Lösung zur Spülung der Kapillare als sehr vorteilhaft erwiesen. Affinitätsuntersuchungen von großen Proteinen wie P-Selektin erfordern die Verwendung einer beschichteten Kapillare mit einer darauf speziell abgestimmten Methode.

Bei den Affinitätsuntersuchungen von Heparinoiden, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, konnte gezeigt werden, dass sich die einzelnen Heparinoide trotz der strukturellen Ähnlichkeit bezüglich ihrer Bindung an ausgewählten Proteinen unterschiedlich verhalten. Im Fall von PPS und Fondaparinux konnten mit Hilfe von Computermodellen und Docking-Untersuchungen mögliche Bindungsstellen an einer Domäne von P-Selektin ermittelt und der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Bindung herausgearbeitet werden. Bei einigen Albuminen ergab sich die interessante Beobachtung, dass durch eine Interaktion mit Heparinoiden der ursprünglich einheitliche Proteinpeak aufgespalten wird. Dies wird zunächst im Sinne einer Konformationsänderung gedeutet, wobei die unterschiedliche Heterogenität der Albumine eine Rolle zu spielen scheint. Eine genauere Untersuchung dieses Phänomens steht aber noch aus und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf einer Volumenreduktion der eingesetzten Proben. Es konnte gezeigt werden, dass man mit einer einfachen inerten Flüssigkeit das Totvolumen der Probengefäße so befüllen kann, dass diese Maßnahme keinen Einfluss auf die Affinitätsuntersuchungen der Proteine mit den Heparinoiden hat.

## 11 Experimenteller Teil

### 11.1 Material

#### 11.1.1 Gerät und Software

Für alle durchgeführten Experimente wurde das Kapillarelektrophoresegerät PrinCE-C760 (Prince Technologies, Emmen, Niederlande) mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) verwendet. Das Integrieren und die Auswertung der Elektropherogramme erfolgten durch die Software DAX3d, die ebenfalls von Prince Technologies auf das Kapillarelektrophoresegerät installiert wurde. Die Elektropherogramme wurden bei 197 nm und 214 nm aufgenommen.

Die Auswertung der Daten für die Wechselwirkungsdiagramme erfolgte mit Hilfe von Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2007 und die Elektropherogramme wurden mit Microsoft Windows Paint<sup>®</sup> dargestellt. Für die Erstellung der Strukturformeln von Heparinoiden sowie für die schematischen Darstellungen dieser Arbeit wurde ChemBio3D Ultra von der Firma PerkinElmer<sup>®</sup> verwendet.

#### 11.1.2 Eingesetzte Kapillare

Alle eingesetzten Kapillaren wurden von Polymicro Technologies (Phoenix, Arizona, USA) zur Verfügung gestellt.

Die meisten durchgeführten kapillarelektrophoretischen Messungen wurden in unbeschichteten *bare fused-silica* Kapillaren mit einer Gesamtlänge von 31 cm (22,5 cm effektive Länge) durchgeführt. Die eingesetzten unbeschichteten Kapillaren hatten einen Innendurchmesser von 50 µm und einen Außendurchmesser von 363 µm.

Für die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen von Protamin und P-Selektin wurden beschichtete *linear polyacrylamide (LPA)* Kapillaren verwendet. Die für die Protamin-Untersuchungen eingesetzten beschichteten Kapillaren hatten einen Innendurchmesser von 75 µm, einen Außendurchmesser von 364 µm und eine Gesamtlänge von 49 cm (40,5 cm effektive Länge). Die Untersuchungen von P-Selektin wurden in beschichtete Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 100 µm, einem Außendurchmesser von 362 µm und einer Gesamtlänge von 40 cm (31,5 cm effektive Länge) durchgeführt.

Für das Detektionsfenster wurde die äußere Polyimidbeschichtung aller Kapillaren mit einem Feuerzeug abgebrannt. Die noch verbliebenden Russpartikel wurden anschließend mit Hilfe von Isopropanol oder Aceton entfernt. Außerdem wurden die beiden Enden der Kapillaren, die in die Vials eintauchen zwecks präziserer Ergebnisse ebenfalls abgebrannt.

Die neuen Kapillaren wurden vor der ersten Anwendung wie folgt vorbereitet:

Die neuen unbeschichteten Kapillaren wurden zuerst mit 1 mol/L Natronlauge für 40 Minuten bei 1000 mbar konditioniert. Anschließend wurde die Kapillare mit Wasser für 10 Minuten ebenfalls bei 1000 mbar durchgespült. Daraufhin erfolgte eine Spülung der Kapillare mit der verwendeten Pufferlösung (Tris) für 30 Minuten bei 2500 mbar, um einen gleichmäßigen EOF herzustellen.

Die neuen LPA beschichteten Kapillaren wurden vor der ersten Anwendung nur mit der Pufferlösung (Acetat oder Tris) für 30 Minuten bei 1200 mbar durchgespült und danach direkt für die Messungen verwendet.

### 11.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien und Reagenzien sind in der Tabelle 11-1 zusammengefasst.

Tabelle 11-1 Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Standort
Acetanilid	Acros Thermo Fischer	Geel, Belgien
Bariumchlorid	Fluka	Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 96%	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kupferchlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Manganchlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Mesityloxid	Fluka	Steinheim, Deutschland
Natriumacetat	Grüssing GmbH Analytika	Filsum, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Nickelchlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Salzsäure 37%	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Silikonöl AP 1000	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

Destilliertes Wasser, das für alle Experimente verwendet wurde, wurde von dem System *water purification system arium pro UF/VF* vor der Firma Satorius Weighing Technology GmbH (Göttingen, Deutschland) vorbereitet. Die Rotilabos-Spritzenfilter wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

## **11.2 Methoden**

### **11.2.1 Pufferlösungen**

Bis auf Untersuchungen, die mit Protamin durchgeführt wurden, ist Tris-Puffer für alle anderen Untersuchungen verwendet worden.

Protamin-Untersuchungen wurden mit einem Acetat-Puffer mit einer Konzentration von 50 mM und einem pH-Wert von 4,0 durchgeführt. Zur Herstellung von Acetat-Puffer wurden 561,0 mg Natriumacetat und 2,4 ml Essigsäure 96 % in einen 1,0 Liter Messkolben gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt.

Der Tris-Puffer wurde in einer Konzentration von 20 mM mit einem pH-Wert von 7,4 eingesetzt. Zur Herstellung von Tris-Puffer wurden 4,85 g Tris als Substanz in ein Becherglas eingewogen, in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure (37 %) auf pH 7,4 gebracht. Anschließend wurde das Ganze in einen 2,0 Liter Messkolben überführt und mit destilliertem Wasser auf 2000,0 ml aufgefüllt.

### **11.2.2 EOF-Markerlösungen**

Es wurden zwei Substanzen als EOF-Marker eingesetzt. Für die Protamin-Untersuchungen wurde Mesityloxid als EOF-Marker verwendet, für alle anderen Untersuchungen Acetanilid.

Zur Herstellung von 0,5 % Mesityloxid-Lösung wurden 50 µl flüssige Mesityloxid mit dem Acetat-Puffer auf 10,0 ml aufgefüllt. Diese Mesityloxid-Stammlösung wurde dann zur Protamin-Lösung gegeben, so dass Mesityloxid eine Endkonzentration von 0,25 % in der Protamin-Lösung erreichte.

30,0 mg Acetanilid wurden in einen Messkolben eingewogen und mit dem Tris-puffer auf 100,0 ml aufgefüllt, so dass eine Acetanilid-Stammlösung in einer

Konzentration von 300 µg/ml hergestellt wurde. Die Endkonzentration von Acetanilid in der Probelösung betrug 100 µg/ml.

### 11.2.3 Probenlösungen

Die Proteine und die toxischen Urinsubstanzen, die als zu untersuchenden Proben verwendet wurden sind in der Tabelle 11-2 dargestellt.

11-2 Eingesetzte Proben

Probe	Hersteller	Standort
β-Lactoglobulin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
ERK1-Peptid	DKFZ	Heidelberg, Deutschland
HSA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
N <sup>7</sup> -Methylguanosin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Myoglobin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ovalbumin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Protamin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
P-Selektin (Fc Tag)	R&D Systems GmbH	Wiesbaden, Deutschland
Vitronectin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

Die Probelösungen wurden in einer Konzentration von 1mg/ml mit dem jeweiligen Puffer hergestellt. Ein bestimmtes Volumen von der Acetanilid-Stammlösung wurde zu den Probelösungen gegeben, so dass Acetanilid eine Endkonzentration von 100 µg/ml erreichte.

### 11.2.4 Ligandenlösungen

Die Heparinoide und die toxischen Urinsubstanzen, die als Ligand verwendet wurden sind in der Tabelle 11-3 dargestellt.

11-3 Eingesetzte Heparinoide und toxische Urinsubstanz als Ligand

Probe	Hersteller	Standort
Enoxaparin-Natrium	CC Pharma GmbH	Densborn, Deutschland
Heparin (unfraktioniert)	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
N <sup>6</sup> -Methyladenosin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
N <sup>7</sup> -Methylguanosin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
PPS (Charge G3)	bene pharmaChem	Geretsried, Deutschland

Die Liganden wurden zuerst in der Konzentration von 2 g/l als Stammlösung in der Pufferlösung hergestellt. Anschließend wurden daraus die verschiedenen

Verdünnungen ebenfalls in der verwendeten Pufferlösung hergestellt. Die Herstellung von Stammlösungen ist in der Tabelle 11-4 zusammengefasst.

11-4 Herstellung verschiedener Liganden in einer Konzentration von 2 g/l

Substanz	Entnommene Menge	Endvolumen
Enoxaparin-Natrium 100 mg/ml	0,20 ml	10 ml
Heparin 25000 I.E.	0,40 ml	10 ml
N <sup>6</sup> -Methyladenosin	0,02 g	10 ml
N <sup>7</sup> -Methylguanosin	0,02 g	10 ml
PPS	0,02 g	10 ml

### 11.3 Trennbedingungen und Spülprotokolle

#### 11.3.1 Extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK)

Es wurden drei synthetisch hergestellte ERK1-Peptide untersucht. Die ERK1-Peptide wurden von der Arbeitsgruppe „Molekulare Strukturanalyse“ unter der Leitung von Prof. Dr. Wolf Dieter Lehmann vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die Aminosäuresequenz der Peptide ist in der Tabelle 11-5 dargestellt.

11-5 Aminosäuresequenz der ERK1-Peptide; „p“ deutet auf die Phosphorylierung hin

Unphosphoryliert	Monophosphoryliert	Diphosphoryliertes
I	I	I
A	A	A
D	D	D
P	P	P
E	E	E
H	H	H
D	D	D
H	H	H
T	T	T
G	G	G
F	F	F
L	L	L
T	T-p	T-p
E	E	E
Y	Y	Y-p
V	V	V
A	A	A
T	T	T
R	R	R



Die affinitätskapillarelektrophoretische Methode zur Untersuchung von ERK1-Peptiden ist in der Tabelle 11-6 dargestellt.

11-6 Verwendete Methode zur Untersuchung von ERK1-Peptiden

Spülschritt	Reagenz	Zeit [min]	Druck [mbar]
Vor jeder Trennung	0,1 M NaOH+ 0,1 M EDTA	2,5	2500
	H <sub>2</sub> O	1	2500
	Tris-Puffer	1,5	2500
Nach 24 Messungen	0,1 M NaOH+ 0,1 M EDTA	10	1000
	H <sub>2</sub> O	5	1000
	Tris-Puffer	30	2500
<b>Trennbedingungen</b>			
Probeninjektion	Hydrodynamisch bei 50 mbar		
Trennungsspannung	10 kV		
Detektionswellenlänge	214 nm		

Zuerst wurde die Kapillare mit 0,1 M Natronlauge + 0,1 M Natrium-EDTA durchgespült. Durch die Zugabe von EDTA zu Natronlauge konnte zum großen Teil sichergestellt werden, dass Metallionen, die noch an der Kapillareninnenwand anhaften durch die Komplexbildung mit EDTA von der Wand abgetrennt und abgespült werden. Die Peptid-Probe wurde für 4,8 Sekunden in die Kapillare injiziert, und um präzisere Ergebnisse zu bekommen, wurde gleich danach Tris-Puffer für 2,4 Sekunden nachinjiziert. Die Liganden wurden bei 2500 mbar für 1,5 Minuten in die Kapillare injiziert. Die elektrophoretische Trennung fand für 8 Minuten statt.

Es wurden 6 Messungen ohne, und 6 Messungen mit dem jeweiligen Metallion als Ligand durchgeführt. Nach jedem Metallion (24 Messungen) wurde die Kapillare gründlich durchgespült (siehe Tabelle 11-6). Die verwendeten Metallionen wurden in 2 verschiedenen Konzentrationen, nämlich 250 µM und

500  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Tabelle 11-7 stellt die Herstellung der Stammlösung der eingesetzten Metallionen dar. Die Stammlösungen wurden mit dem Tris-Puffer zu den jeweiligen Endkonzentrationen weiterverdünnt.

11-7 Eingesetzte Metallionen und die Herstellung der Stammlösungen davon

Metallsalz	Konzentration	Einwaage	Endvolumen
$\text{BaCl}_2$	5 mM	26,03 mg	25,0 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 mM	18,38 mg	25,0 ml
$\text{CuCl}_2$	5 mM	16,81 mg	25,0 ml
$\text{MgCl}_2$	5 mM	11,90 mg	25,0 ml
$\text{MnCl}_2$	5 mM	15,73 mg	25,0 ml
$\text{NiCl}_2$	5 mM	16,20 mg	25,0 ml

### 11.3.2 Protamin

Die Untersuchungen von Protamin wurden in beschichteten LPA-Kapillaren mit Acetat-Puffer durchgeführt (siehe Abschnitt 11.1.2 und 11.2.1). Die verwendete affinitätskapillarelektrophoretische Methode setzte sich aus folgenden Schritten zusammen.

Zuerst wurde die LPA-Kapillare mit 1 M Salzsäure für 2 Minuten bei 1200 mbar durchgespült. Daraufhin erfolgte die Spülung der LPA-Kapillare mit dem destillierten Wasser bei demselben Druck ebenfalls für 2 Minuten. Danach wurde die LPA-Kapillare mit dem Acetat-Puffer bei 1000 mbar für 5 Minuten gespült. Die Injektion der Protamin-Probe erfolgte hydrodynamisch bei 40 mbar für 12 Sekunden. Die Liganden wurden bei 1000 mbar für 2 Minuten in die Kapillare injiziert und die elektrophoretische Trennung fand bei 25 kV für 20 Minuten statt. Nach alle 10 Messungen wurde die Kapillare mit 2 M Salzsäure für 5 Minuten gespült, daraufhin mit dem destillierten Wasser ebenfalls für 5 Minuten, und am Schluss für 30 Minuten mit dem Acetat-Puffer durchgespült. Alle diese Spülschritte erfolgten bei 1200 mbar.

### 11.3.3 BSA, HSA, Standardproteinen und Vitronectin

Die affinitätskapillarelektrophoretische Methode zur Untersuchung von BSA, HSA, Standardproteine und Vitronectin ist in der Tabelle 11-8 dargestellt.

<b>Spülschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Druck [mbar]</b>
Vor jeder Trennung	0,1 M NaOH	2,5	2500
	H <sub>2</sub> O	1	2500
	Tris-Puffer	1,5	2500
Nach			
12 Messungen	0,1 M NaOH	5	1000
	H <sub>2</sub> O	10	1000
	Tris-Puffer	30	2500
<b>Trennbedingungen</b>			
Probeninjektion	Hydrodynamisch bei 50 mbar		
Trennungsspannung	15 kV		
Detektionswellenlänge	195 nm und 214 nm		

Die Protein-Proben wurden für 6 Sekunden in die Kapillare injiziert, und um präzisere Ergebnisse zu bekommen wurde gleich danach Tris-Puffer für 2,4 Sekunden nachinjiziert. Die Liganden wurden bei 2500 mbar für 1,5 Minuten in die Kapillare injiziert. Die elektrophoretische Trennung fand für 5-10 Minuten statt.

Es wurden 6 Messungen ohne, und 6 Messungen mit dem jeweiligen Heparinoid als Ligand durchgeführt. Nach jeder Heparinoid-Konzentration (12 Messungen) wurde die Kapillare gründlich durchgespült (siehe Tabelle 11-8). Die verwendeten Heparinoide wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (siehe Abschnitte 5 und 6). Die Herstellung der Stammlösung der eingesetzten Heparinoide ist in der Tabelle 11-4 dargestellt. Die Stammlösungen wurden mit dem Tris-Puffer zu den jeweiligen Endkonzentrationen weiterverdünnt.

#### 11.3.4 Eignungstest der kleinen Probenvolumina

Da die Mikrovials (Probevials) des Kapillarelektrophoresegerätes, mit dem die Messungen durchgeführt wurden (siehe Abschnitt 11.1.1) ein gewisses Totvolumen von 10 µl aufweisen, wurde zum Befüllen dieses Totvolumens ein bestimmtes Silikonöl (AP 1000, Viskosität ~ 1000 mPa.s, Dichte ~ 1,09 g/ml) verwendet. Die Vorteile des Arbeitens mit den kleinen Probenvolumina sind im Abschnitt 7 ausführlich diskutiert.

Abbildung 11-1 zeigt das Befüllen eines Mikrovials, wozu eine 10 ml Einmalspritze und eine Kanüle (Sterican<sup>®</sup>, Ø 1,10 x 50 mm, 19 G x 2“) verwendet wurden. Auf das Silikonöl wurde die Probelösung gegeben, wodurch der Probeneinsatz auf mindestens die Hälfte reduziert wurde. Das Kapillarende tauchte somit nur in die Probelösung ein (siehe Abbildung 11-2).



Abbildung 11-1 Befüllen eines Probenvials mit Hilfe von einer Einmalspritze und einer Kanüle.



Abbildung 11-2 Schematische Darstellung eines Probenvials (links), und ein Probenvial mit Zentimetermaßstab (rechts). Das Kapillarende taucht nur in die Probeflüssigkeit ein.

Die kapillarelektrophoretische Methode, die zum Eignungstest mittels Standardproteinen eingesetzt wurde, ist in der Tabelle 11-9 dargestellt.

11-9 Verwendete Methode zum Eignungstest der kleinen Probenvolumina

Spülschritt	Reagenz	Zeit [min]	Druck [mbar]
Vor jeder Trennung	0,1 M NaOH	2,5	2500
	H <sub>2</sub> O	1	2500
	Tris-Puffer	1,5	2500
Nach			
12 Messungen	0,1 M NaOH	10	1000
	H <sub>2</sub> O	5	1000
	Tris-Puffer	30	2500
<b>Trennbedingungen</b>			
Probeninjektion	Hydrodynamisch bei 50 mbar		
Trennungsspannung	15 kV		
Detektionswellenlänge	214 nm		

Die Protein-Proben wurden für 6 Sekunden in die Kapillare injiziert, und um präzisere Ergebnisse zu bekommen, wurde gleich danach Tris-Puffer für 2,4 Sekunden nachinjiziert. Die Liganden wurden bei 2500 mbar für 1,5 Minuten in die Kapillare injiziert. Die elektrophoretische Trennung fand für 10-15 Minuten statt.

Es wurden 6 Messungen ohne, und 6 Messungen mit dem jeweiligen Heparinoid als Ligand durchgeführt. Nach jeder Heparinoid-Konzentration (12 Messungen) wurde die Kapillare gründlich durchgespült (siehe Tabelle 11-9). Die verwendeten Heparinoide wurden in der Konzentration von 20 mg/l eingesetzt (siehe Abschnitt 7). Die Herstellung der Stammlösung der eingesetzten Heparinoide ist in der Tabelle 11-4 dargestellt. Die Stammlösungen wurden mit dem Tris-Puffer zu der Endkonzentration weiterverdünnt.

Alle Messungen wurden in Ab- und Anwesenheit von Silikonöl durchgeführt und die Ergebnisse wurden miteinander verglichen (siehe Abschnitt 7).

#### **11.3.5 P-Selektin**

Zur affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchung von P-Selektin wurden LPA-Kapillaren eingesetzt (siehe Abschnitt 11.1.2). Die verwendete Methode zur Affinitätsuntersuchung von P-Selektin mit den Heparinoiden ist in der Tabelle 11-10 zusammengefasst. Die neuen LPA-Kapillaren wurden vor der ersten Anwendung mit dem Tris-Puffer bei 2500 mbar für 30 Minuten durchgespült und direkt danach für die Messungen verwendet.

11-10 Verwendete Methode zur Untersuchung von P-Selektin

Spülschritt	Reagenz	Zeit [min]	Druck [mbar]
Vor jeder Trennung	1 M HCl	2	1200
	H <sub>2</sub> O	2	2500
	Tris-Puffer	6	2500
Nach			
12 Messungen	1 M HCl	5	1200
	H <sub>2</sub> O	5	2500
	Tris-Puffer	30	2500
<b>Trennbedingungen</b>			
Probeninjektion	Hydrodynamisch bei 70 mbar		
Trennungsspannung	12 kV		
Detektionswellenlänge	195 nm		

Die P-Selektin-Proben wurden für 3,6 Sekunden in die Kapillare injiziert, und um präzisere Ergebnisse zu bekommen, wurde gleich danach Tris-Puffer für 2,4 Sekunden nachinjiziert. Die Liganden wurden bei 2500 mbar für 6 Minuten in die Kapillare injiziert. Die elektrophoretische Trennung fand für 20 Minuten statt.

Es wurden 6 Messungen ohne, und 6 Messungen mit dem jeweiligen Heparinoid als Ligand durchgeführt. Nach jeder Heparinoid-Konzentration (12 Messungen) wurde die Kapillare gründlich durchgespült (siehe Tabelle 11-10). Die verwendeten Heparinoide wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (siehe Abschnitt 8). Die Herstellung der Stammlösung der eingesetzten Heparinoide ist in der Tabelle 11-4 dargestellt. Die Stammlösungen wurden mit dem Tris-Puffer zu den jeweiligen Endkonzentrationen weiterverdünnt.

### 11.3.6 Toxische Urinsubstanzen

Die untersuchten toxischen Metaboliten von Nukleinsäuren sind folgendermaßen vermessen worden.

N<sup>7</sup>-Methylguanosin wurde direkt als Probe vermessen, und N<sup>6</sup>-Methyladenosin wurde indirekt vermessen. Die indirekte Messung von N<sup>6</sup>-Methyladenosin wurde mit Hilfe von HSA als Hilfsprotein durchgeführt. Dazu wurde einerseits N<sup>6</sup>-Methyladenosin in HSA für 12 Stunden inkubiert und anschließend die Wechselwirkungen von HSA + N<sup>6</sup>-Methyladenosin mit den Heparinoiden gemessen, andererseits wurde N<sup>6</sup>-Methyladenosin in die jeweiligen Heparinoid-Lösung gegeben, ebenfalls für 12 Stunden inkubiert und anschließend die Wechselwirkungen von N<sup>6</sup>-Methyladenosin + Heparinoid mit HSA gemessen. Die chemischen Strukturen der toxischen Metabolite und die Vorbereitung der Proben sind in Abbildung 11-3 schematisch dargestellt.

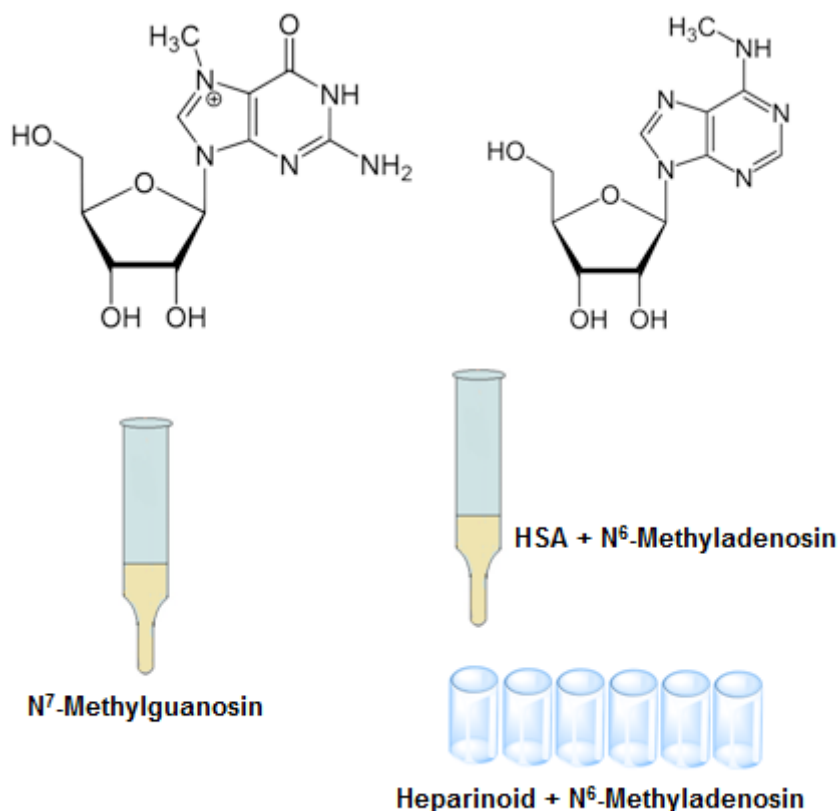


Abbildung 11-3 Chemische Struktur und die Vorbereitung der Proben von N<sup>7</sup>-Methylguanosin (links) und N<sup>6</sup>-Methyladenosin (rechts).



Die verwendete Affinitätskapillarelektrophoretische Methode zur Untersuchung von den toxischen Metaboliten im Urin ist in der Tabelle 11-11 dargestellt.

11-11 Verwendete Methode zur Untersuchung von toxischen Metaboliten

Spülschritt	Reagenz	Zeit [min]	Druck [mbar]
Vor jeder Trennung	0,1 M NaOH	2,5	2500
	H <sub>2</sub> O	1	2500
	Tris-Puffer	1,5	2500
Nach			
12 Messungen	0,1 M NaOH	10	1000
	H <sub>2</sub> O	5	1000
	Tris-Puffer	30	2500
<b>Trennbedingungen</b>			
Probeninjektion	Hydrodynamisch bei 50 mbar		
Trennungsspannung	15 kV		
Detektionswellenlänge	195 nm		

Die Proben wurden für 6 Sekunden in die Kapillare injiziert, und um präzisere Ergebnisse zu bekommen, wurde gleich danach Tris-Puffer für 2,4 Sekunden nachinjiziert. Die Liganden wurden bei 2500 mbar für 1,5 Minuten in die Kapillare injiziert. Die elektrophoretische Trennung fand für 5 Minuten statt.

Es wurden 6 Messungen ohne, und 6 Messungen mit dem jeweiligen Heparinoid bzw. Heparinoid-Metabolit-Mischung als Ligand durchgeführt. Nach jeder Heparinoid-Konzentration (12 Messungen) wurde die Kapillare gründlich durchgespült (siehe Tabelle 11-11). Die verwendeten Liganden wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (siehe Abschnitt 9). Die Herstellung der Stammlösung der eingesetzten Heparinoide und Metabolit-Substanzen ist in der Tabelle 11-4 dargestellt. Die Stammlösungen wurden mit dem Tris-Puffer zu den jeweiligen Endkonzentrationen weiterverdünnt.

## 12 Literaturverzeichnis

- 1.Kuhn, R. Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. Heinz Engelhard, Wolfgang Beck and Thomas Schmitt Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1994; pp. 206, ISBN 3-528-06597-4. *Electrophoresis* **1995**, 16, 158–159.
- 2.Landers, J.P., Ed. *Handbook of capillary electrophoresis*, 2<sup>nd</sup> ed; CRC Press: Boca Raton, 1997.
- 3.Alhazmi, H.A.; Nachbar, M.; Albishri, H.M.; Abd El-Hady, D.; Redweik, S.; El Deeb, S.; Wätzig, H. A comprehensive platform to investigate protein-metal ion interactions by affinity capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2015**, 107, 311–317.
- 4.Redweik, S. *Mobilily-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese: eine schnelle und präzise Methode zur Überprüfung von Liganden-Einflüssen auf Proteine*; veröffentlichte Dissertationsarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, **2013**, 17 ff.
- 5.Ternes, W. *Biochemie der Elemente: Anorganische Chemie biologischer Prozesse*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013.
- 6.Garg, H.G.; Hales, C.A.; Linhardt, R.J., Eds. *Chemistry and biology of heparin and heparan sulfate*, 1<sup>st</sup> ed; Elsevier: Amsterdam, Boston, London, 2005.
- 7.IARC Monographs. Pentosan Polysulfate Sodium. *IARC Monographs* **2013**, 251–262.
- 8.Abel-Haq, H.; Bossù, E. Capillary electrophoresis as a tool for the characterization of pentosan nanoparticles. *Journal of chromatography A* **2012**, 1257, 125–130.
- 9.Dürüst, N.; Meyerhoff, M.E. Determination of pentosan polysulfate and its binding to polycationic species using polyion-sensitive membrane electrodes. *Analytica Chimica Acta* **2001**, 432, 253–260.
- 10.Degenhardt, M.; Benend, H.; Wätzig, H. Quality control of pentosane polysulfate by capillary zone electrophoresis using indirect detection. *Journal of chromatography A* **1998**, 817, 297–306.

- 11.Schirm, B.; Benend, H.; Wätzig, H. Improvements in pentosan polysulfate sodium quality assurance using fingerprint electropherograms. *Electrophoresis* **2001**, 22, 1150–1162.
- 12.Degenhardt, M.; Ghosh, P.; Wätzig, H. Studies on the structural variations of pentosan polysulfate sodium (NaPPS) from different sources by capillary electrophoresis. *Archiv der Pharmazie – pharmaceutical and medicinal chemistry*. **2001**, 334, 27–29.
- 13.Wang, X.; Lee, J.-T.; Armstrong, D.W. Separation of enantiomers by capillary electrophoresis using pentosan polysulfate. *Electrophoresis* **1999**, 20, 162–170.
- 14.Prochazka, S.; Mulholland, M.; Lloyd-Jones, A. Optimisation for the separation of the oligosaccharide, sodium pentosan polysulfate by reverse polarity capillary zone electrophoresis using a central composite design. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2003**, 31, 133–141.
- 15.Schuchman, E.H.; Ge, Y.; Lai, A.; Borisov, Y.; Faillace, M.; Eliyahu, E.; He, X.; Iatridis, J.; Vlassara, H.; Striker, G.; *et al.* Pentosan polysulfate: A novel therapy for the mucopolysaccharidoses: A novel therapy for the mucopolysaccharidoses. *PloS one* **2013**, 8, e54459.
- 16.Parsons, C.L.; Forrest, J.; Nickel, J.C.; Evans, R.; Lloyd, L.K.; Barkin, J.; Mosbaugh, P.G.; Kaufman, D.M.; Hernandez-Graulau, J.M.; Atkinson, L.; *et al.* Effect of pentosan polysulfate therapy on intravesical potassium sensitivity. *Urology* **2002**, 59, 329–333.
- 17.Anderson, V.R.; Perry, C.M. Pentosan polysulfate: A review of its use in the relief of bladder pain or discomfort in interstitial cystitis. *Drugs* **2006**, 66, 821–835.
- 18.Zaslau, S.; Riggs, D.R.; Jackson, B.J.; Adkins, F.C.; John, C.C.; Kandzari, S.J.; McFadden, D.W. In vitro effects of pentosan polysulfate against malignant breast cells. *American journal of surgery* **2004**, 188, 589–592.
- 19.Fumagalli, F.; Molteni, R.; Calabrese, F.; Frasca, A.; Racagni, G.; Riva, M.A. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in rat brain. *Journal of neurochemistry* **2005**, 93, 1551–1560.

20. Grewal, S.S.; York, R.D.; Stork, P.J.S. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Current Opinion in Neurobiology* **1999**, *9*, 544–553.
21. Kehat, I.; Molkentin, J.D. Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Annals of the New York academy of sciences* **2010**, *1188*, 96–102.
22. Robbins, D.J.; Zhen, E.; Owaki, H.; Vanderbilt, C.A.; Ebert, D.; Geppert, T.D.; Cobb, M.H. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *Journal of biological chemistry*. **1993**, *268*, 5097–5106.
23. Yoon, S.; Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **2006**, *24*, 21–44.
24. Kolch, W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal* **2000**, *351 Pt 2*, 289–305.
25. Rubinfeld, H.; Seger, R. The ERK Cascade: A Prototype of MAPK Signaling. *MB* **2005**, *31*, 151–174.
26. Samet, J.M.; Graves, L.M.; Quay, J.; Dailey, L.A.; Devlin, R.B.; Ghio, A.J.; Wu, W.; Bromberg, P.A.; Reed, W. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *The American journal of physiology* **1998**, *275*, L551-8.
27. Simón-Vázquez, R.; Lozano-Fernández, T.; Dávila-Grana, A.; González-Fernández, Á. Analysis of the activation routes induced by different metal oxide nanoparticles on human lung epithelial cells. *Future science OA* **2016**, *2*, FSO118.
28. Racanelli, A.; Fareed, J.; Walenga, J.M.; Coyne, E. Biochemical and pharmacologic studies on the protamine interactions with heparin, its fractions and fragments. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **1985**, *11*, 176–189.
29. Arzneibuch Kommentar. Protamini sulfas. *Kommentar zur Ph. Eur. 7.0* **2011**, 39. Lfg. 2011.

- 30.Xue, F.; Liu, L.; Mi, Y.; Han, H.; Liang, J. Investigation the interaction between protamine sulfate and CdTe quantum dots with spectroscopic techniques. *RSC Adv* **2016**, 6, 10215–10220.
- 31.Carr, J.A.; Silverman, N. The heparin-protamine interaction. A review. *The Journal of cardiovascular surgery* **1999**, 40, 659–666.
- 32.Awotwe-Otoo, D.; Agarabi, C.; Faustino, P.J.; Habib, M.J.; Lee, S.; Khan, M.A.; Shah, R.B. Application of quality by design elements for the development and optimization of an analytical method for protamine sulfate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2012**, 62, 61–67.
- 33.Abramova, N.; Bratov, A. Title monitoring protamine-heparin interactions using microcapillary impedimetric sensor. *Electroanalysis* **2015**, 27, 663–669.
- 34.Jaques, L.B. The reaction of heparin with proteins and complex bases. *The Biochemical journal* **1943**, 37, 189–195.
- 35.Ishihara, M. Low-molecular-weight heparin and protamine-based polyelectrolyte nano complexes for protein delivery (A Review Articles). *JBNB* **2011**, 02, 500–509.
- 36.Jaques, L.B. Protamine antagonist to heparin. *Canadian medical association journal* **1973**, 108, 1291–1297.
- 37.Graf, M.; Galera García, R.; Wätzig, H. Protein adsorption in fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries. *Electrophoresis* **2005**, 26, 2409–2417.
- 38.Assifaoui, A.; Huault, L.; Maissiat, C.; Roullier-Gall, C.; Jeandet, P.; Hirschinger; Raya; Jaber, M.; Lambert; Cayot, P.; *et al.* Structural studies of adsorbed protein (betalactoglobulin) on natural clay (montmorillonite). *RSC Adv* **2014**, 4, 61096–61103.
- 39.Borges, J.; Campiña, J.M.; Souza; Goncalves, M.P.; Silva, A.F. Aggregation-induced conformational transitions in bovine: beta-lactoglobulin adsorbed onto open chitosan structures. *Soft Matter* **2012**, 8, 1190–1201.
- 40.Bromley, E.H.C.; Krebs, M.R.H.; Donald, A.M. Aggregation across the length-scales in: -lactoglobulin. *Faraday Discuss* **2005**, 128, 13–27.
- 41.Shi, J.-H.; Pan, D.-Q.; Wang, X.-X.; Liu, T.-T.; Jiang, M.; Wang, Q. Characterizing the binding interaction between antimalarial artemether (AMT) and bovine serum albumin (BSA): Spectroscopic and molecular

- docking methods. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2016**, 162, 14–23.
- 42.Ribeiro Alves, M.R.; Zuñiga, A.D.G.; Sousa, R.d.C.S.; Zacchi Scolforo, C. The process of separating bovine serum albumin using hydroxyapatite and active babassu coal (*Orbignya martiana*). *The scientific world journal* **2016**, 2016, 2808241.
- 43.Roy, S.; Nandi, R.K.; Ganai, S.; Majumdar, K.C.; Das, T.K. Binding interaction of phosphorus heterocycles with bovine serum albumin: A biochemical study. *Journal of pharmaceutical analysis* **2017**, 7, 19–26.
- 44.Fathi, F.; Ezzati Nazhad Dolatanbadi, J.; Rashidi, M.-R.; Omid, Y. Kinetic studies of bovine serum albumin interaction with PG and TBHQ using surface plasmon resonance. *International journal of biological macromolecules* **2016**, 91, 1045–1050.
- 45.Wallevik, K. Spontaneous in vivo isomerization of bovine serum albumin as a determinant of its normal catabolism. *The Journal of clinical investigation* **1976**, 57, 398–407.
- 46.Fanali, G.; Di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular aspects of medicine* **2012**, 33, 209–290.
- 47.Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering* **1999**, 12, 439–446.
- 48.Lomis, N.; Westfall, S.; Farahdel, L.; Malhotra, M.; Shum-Tim, D.; Prakash, S. Human serum albumin nanoparticles for use in cancer drug delivery: process optimization and in vitro characterization. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2016**, 6.
- 49.Kobayashi, K. Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals: journal of the international association of biological standardization* **2006**, 34, 55–59.
- 50.Chuang, V.T.G.; Otagiri, M. Stereoselective binding of human serum albumin. *Chirality* **2006**, 18, 159–166.

- 51.Zhou, X.; Lü, W.; Su, L.; Dong, Y.; Li, Q.; Chen, X. The binding affinity of amino acid-protein: Hydroxyproline binding site I on human serum albumin. *Organic and biomolecular chemistry* **2012**, *10*, 8314–8321.
- 52.Dockal, M.; Carter, D.C.; Ruker, F. The three recombinant domains of human serum albumin: Structural characterization and ligand binding properties. *Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 29303–29310.
- 53.Hu, Y.-J.; Liu, Y.; Xiao, X.-H. Investigation of the interaction between berberine and human serum albumin. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 517–521.
- 54.Dockal, M. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *Journal of biological chemistry* **2000**, *275*, 3042–3050.
- 55.Fujiwara, S.-I.; Amisaki, T. Molecular dynamics study of conformational changes in human serum albumin by binding of fatty acids. *Proteins* **2006**, *64*, 730–739.
- 56.Kragh-Hansen, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacological reviews* **1981**, *33*, 17–53.
- 57.Hayashi, T.; Murata, D.; Makino, M.; Sugimoto, H.; Matsuo, T.; Sato, H.; Shiro, Y.; Hisaeda, Y. Crystal structure and peroxidase activity of myoglobin reconstituted with iron porphycene. *Inorganic chemistry* **2006**, *45*, 10530–10536.
- 58.Kendrew, J.C.; Bodo, G.; Dintzis, H.M.; Parrish, R.G.; Wyckow, H.; Phillips, D.C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **1958**, *181*, 662–666.
- 59.Silverstein, T.P.; Kirk, S.R.; Meyer, S.C.; Holman, K.L.M. Myoglobin structure and function: A multiweek biochemistry laboratory project. *Biochemistry and molecular biology education: a bimonthly publication of the international union of biochemistry and molecular biology* **2015**, *43*, 181–188.
- 60.Vojtěchovský, J.; Chu, K.; Berendzen, J.; Sweet, R.M.; Schlichting, I. Crystal structures of myoglobin-ligand complexes at near-atomic resolution. *Biophysical journal* **1999**, *77*, 2153–2174.

61. Huntington, J.A.; Stein, P.E. Structure and properties of ovalbumin. *Journal of chromatography B: Biomedical sciences and applications* **2001**, 756, 189–198.
62. Li, X.; Yan, Y. Comparative study of the interactions between ovalbumin and five antioxidants by spectroscopic methods. *Journal of fluorescence* **2017**, 27, 213–225.
63. Weijers, M.; Sagis, L.M.C.; Veerman, C.; Sperber, B.; van der Linden, E. Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids* **2002**, 16, 269–276.
64. Yamasaki, M.; Takahashi, N.; Hirose, M. Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form. *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, 35524–35530.
65. Aaboe, M.; Offersen, B.V.; Christensen, A.; Andreasen, P.A. Vitronectin in human breast carcinomas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular basis of disease* **2003**, 1638, 72–82.
66. Preissner, K. Structure and biological role of vitronectin. *Annual review of cell and developmental biology* **1991**, 7, 275–310.
67. Preissner, K.T. The role of vitronectin as multifunctional regulator in the hemostatic and immune systems. *Blut* **1989**, 59, 419–431.
68. Suzuki, S.; Pierschbacher, M.D.; Hayman, E.G.; Nguyen, K.; Ohgren, Y.; Ruoslahti, E. Domain structure of vitronectin. Alignment of active sites. *Journal of biological chemistry* **1984**, 259, 15307–15314.
69. Wang, A.-G.; Yen, M.-Y.; Hsu, W.-M.; Fann, M.-J. Induction of vitronectin and integrin  $\alpha_5\beta_1$  in the retina after optic nerve injury. *Molecular vision* **2006**, 12, 76–84.
70. Underwood, P.A.; Kirkpatrick, A.; Mitchell, S.M. New insights into heparin binding to vitronectin: Studies with monoclonal antibodies. *The Biochemical journal* **2002**, 365, 57–67.
71. Anderot, M.; Nilsson, M.; Végvári, A.; Moeller, E.H.; van de Weert, M.; Isaksson, R. Determination of dissociation constants between polyelectrolytes and proteins by affinity capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2009**, 877, 892–896.



- 72.Hattori, T.; Kimura, K.; Seyrek, E.; Dubin, P.L. Binding of bovine serum albumin to heparin determined by turbidimetric titration and frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry* **2001**, 295, 158–167.
- 73.Fedunová, D.; Antalík, M. Studies on interactions between metmyoglobin and heparin. *General physiology and biophysics* **1998**, 17, 117–131.
- 74.Guyot, N.; Labas, V.; Harichaux, G.; Chessé, M.; Poirier, J.-C.; Nys, Y.; Réhault-Godbert, S. Proteomic analysis of egg white heparin-binding proteins: Towards the identification of natural antibacterial molecules. *Scientific reports* **2016**, 6, 27974.
- 75.Xu, D.; Baburaj, K.; Peterson, C.B.; Xu, Y. Model for the three-dimensional structure of vitronectin: Predictions for the multi-domain protein from threading and docking. *Proteins* **2001**, 44, 312–320.
- 76.Mozafari, M.; Nachbar, M.; El Deeb, S. Precise small volume sample handling for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2015**, 36, 2665–2669.
- 77.Zeng, H.; Weng, Y.; Ikeda, S.; Nakagawa, Y.; Nakajima, H.; Uchiyama, K. Accurate and highly reproducible picoliter injection system for capillary electrophoresis. *Analytical chemistry* **2012**, 84, 10537–10542.
- 78.Mark, J.J.P.; Beutner, A.; Cindric, M.; Matysik, F.-M. Microanalytical study of sub-nanoliter samples by capillary electrophoresis – mass spectrometry with 100 % injection efficiency. *Microchim Acta* **2015**, 182, 351–359.
- 79.Vandaveer; Fritsch, I. Measurement of ultras small volumes using anodic stripping voltammetry. *Analytical chemistry*. **2002**, 74, 3575–3578.
- 80.Danese, S.; Semeraro, S.; Marini, M.; Roberto, I.; Armuzzi, A.; Papa, A.; Gasbarrini, A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: Therapeutic implications for gut inflammation. *Digestive and liver disease: official journal of the italian society of gastroenterology and the italian association for the study of the liver* **2005**, 37, 811–818.
- 81.Lorant, D.E.; Topham, M.K.; Whatley, R.E.; McEver, R.P.; McIntyre, T.M.; Prescott, S.M.; Zimmerman, G.A. Inflammatory roles of P-selectin. *The Journal of clinical investigation* **1993**, 92, 559–570.
- 82.Ley, K.; Kansas, G.S. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nature reviews. Immunology* **2004**, 4, 325–335.

- 83.Matsui, N.M.; Varki, A.; Embury, S.H. Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin. *Blood* **2002**, *100*, 3790–3796.
- 84.Sloan, C.L.; Sloan, G.J.; Cannon, J.G. Anti-inflammatory influence of P-selectin on human mononuclear cells. *Vascular pharmacology* **2006**, *44*, 166–169.
- 85.Barondes, S.H. Bifunctional properties of lectins: Lectins redefined. *Trends in biochemical sciences* **1988**, *13*, 480–482.
- 86.Ernst, B.; Magnani, J.L. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **2009**, *8*, 661–677.
- 87.Drickamer, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Journal of biological chemistry* **1988**, *263*, 9557–9560.
- 88.Vestweber, D., Ed. *The selectins: Initiators of leukocyte endothelial adhesion*; Harwood Academic: Amsterdam, 1997.
- 89.Green, D. Coagulation cascade. *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis* **2006**, *10 Suppl 2*, S2-4.
- 90.Hollenbaugh, D.; Aruffo, A.; Senter, P.D. Effects of chemical modification on the binding activities of P-Selectin mutants. *Biochemistry* **2002**, *34*, 5678–5684.
- 91.Sako, D.; Chang, X.-J.; Barone, K.M.; Vachino, G.; White, H.M.; Shaw, G.; Veldman, G.M.; Bean, K.M.; Ahern, T.J.; Furie, B.; *et al.* Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* **1993**, *75*, 1179–1186.
- 92.Subramaniam, M.; Koedam, J.A.; Wagner, D.D. Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Molecular biology of the cell* **1993**, *4*, 791–801.
- 93.Chasman, D.I.; Paré, G. Getting closer to p-selectin. *Clinical chemistry* **2009**, *55*, 1051–1052.
- 94.Zimmerman, G.A.; Prescott, S.M.; McIntyre, T.M. Endothelial cell interactions with granulocytes: Tethering and signaling molecules. *Immunology today* **1992**, *13*, 93–100.
- 95.Varki, A. Selectin ligands: Will the real ones please stand up? *The Journal of clinical investigation* **1997**, *100*, S31-5.
- 96.André, P. P-selectin in haemostasis. *British journal of haematology* **2004**, *126*, 298–306.

97. Wilkins, P.P.; Moore, K.L.; McEver, R.P.; Cummings, R.D. Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 22677–22680.
98. Berg, E.L.; Robinson, M.K.; Mansson, O.; Butcher, E.C.; Magnani, J.L. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *Journal of biological chemistry* **1991**, *266*, 14869–14872.
99. Revelle, B.M.; Scott, D.; Kogan, T.P.; Zheng, J.; Beck, P.J. Structure-function analysis of P-selectin-sialyl lewis binding interactions. *Journal of biological chemistry* **1996**, *271*, 4289–4297.
100. Norman, K.E.; Moore, K.L.; McEver, R.P.; Ley, K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* **1995**, *86*, 4417–4421.
101. Vachino, G.; Chang, X.-J.; Veldman, G.M.; Kumar, R.; Sako, D.; Fouser, L.A.; Berndt, M.C.; Cumming, D.A. P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 21966–21974.
102. Moore, K.L.; Patel, K.D.; Bruehl, R.E.; Li, F.; Johnson, D.A.; Lichenstein, H.S.; Cummings, R.D.; Bainton, D.F.; McEver, R.P. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *The Journal of cell biology* **1995**, *128*, 661–671.
103. Hartwell, D.W.; Mayadas, T.N.; Berger, G.; Frenette, P.S.; Rayburn, H.; Hynes, R.O.; Wagner, D.D. Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *The Journal of cell biology* **1998**, *143*, 1129–1141.
104. Merten, M.; Thiagarajan, P. P-selectin in arterial thrombosis. *Zeitschrift für Kardiologie* **2004**, *93*, 855–863.
105. Zhu, H.; Wang, Y.; Zhao, M.; Wu, J.; Zhang, X.; Yang, G.; Peng, S. Energy minimized crystal structures of P-selectins based on molecular dynamics simulation: Leading to two average structures capable of designing anti-thrombotic agents. *Medicinal chemistry communications* **2013**, *4*, 1066.
106. Borsig, L. Selectins facilitate carcinoma metastasis and heparin can prevent them. *News in physiological sciences* **2004**, *19*, 16–21.

- 107.Redweik, S.; Xu, Y.; Wätzig, H. Precise, fast, and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis: Part 1: performance. *Electrophoresis* **2012**, 33, 3316–3322.
- 108.Wang, J.-G.; Geng, J.-G. Affinity and kinetics of P-selectin binding to heparin. *Thrombosis and haemostasis* **2003**, 90, 309–316.
- 109.Mewhort-Buist, T.A.; Junop, M.; Berry, L.R.; Chindemi, P.; Chan, A.K.C. Structural effects of a covalent linkage between antithrombin and heparin: Covalent N-terminus attachment of heparin enhances the maintenance of antithrombin's activated state. *Journal of biochemistry* **2006**, 140, 175–184.
- 110.Kowalczykowski, S.C.; Paul, L.S.; Lonberg, N.; Newport, J.W.; McSwiggen, J.A.; Hippel, P.H. von. Cooperative and noncooperative binding of protein ligands to nucleic acid lattices: Experimental approaches to the determination of thermodynamic parameters. *Biochemistry* **1986**, 25, 1226–1240.
- 111.Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* **2000**, 28, 235–242.
- 112.Somers, W.S.; Tang, J.; Shaw, G.D.; Camphausen, R.T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLeX and PSGL-1. *Cell* **2000**, 103, 467–479.
- 113.Altschul, S. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **1990**, 215, 403–410.
- 114.Phillips, M.L.; Nudelman, E.; Gaeta, F.C.; Perez, M.; Singhal, A.K.; Hakomori, S.; Paulson, J.C. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science (New York, N.Y.)* **1990**, 250, 1130–1132.
- 115.Preston, R.C.; Jakob, R.P.; Binder, F.P.C.; Sager, C.P.; Ernst, B.; Maier, T. E-selectin ligand complexes adopt an extended high-affinity conformation. *Journal of molecular cell biology* **2016**, 8, 62–72.
- 116.Walz, G.; Aruffo, A.; Kolanus, W.; Bevilacqua, M.; Seed, B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science (New York, N.Y.)* **1990**, 250, 1132–1135.

- 117.Schwizer, D.; Patton, J.T.; Cutting, B.; Smieško, M.; Wagner, B.; Kato, A.; Weckerle, C.; Binder, F.P.C.; Rabbani, S.; Schwardt, O.; *et al.* Pre-organization of the core structure of E-selectin antagonists. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2012**, *18*, 1342–1351.
- 118.Binder, F.P.C.; Lemme, K.; Preston, R.C.; Ernst, B. Sialyl Lewis(x): A “pre-organized water oligomer” *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2012**, *51*, 7327–7331.
- 119.St. Sherbooke West, S. MOE=Molecular Operating Environment (MOE). *Chemical Computing Group ULC* **2016**, H3A2R7.
- 120.Argade, S.; Berecz, Z.; Su, Y.; Parsons, C.L. Increased toxic urinary cations in males with interstitial cystitis: A possible cause of bladder symptoms. *World journal of urology* **2016**, *34*, 1685–1691.
- 121.Rosenberg, M.T.; Newman, D.K.; Page, S.A. Interstitial cystitis/painful bladder syndrome: Symptom recognition is key to early identification, treatment. *Cleveland clinic journal of medicine* **2007**, *74 Suppl 3*, S54-62.
- 122.Seth, A.; Teichman, J.M.H. What’s new in the diagnosis and management of painful bladder syndrome/interstitial cystitis? *Current urology reports* **2008**, *9*, 349–357.
- 123.Yoost, J.L.; Hertweck, S.P.; Loveless, M. Diagnosis and treatment of interstitial cystitis in adolescents. *Journal of pediatric and adolescent gynecology* **2012**, *25*, 162–171.
- 124.ICS Terminology. Painful bladder syndrome.
- 125.Lewis, S.A. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *American journal of physiology. Renal physiology* **2000**, *278*, F867-74.
- 126.Birder, L.A. More than just a barrier: Urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *American journal of physiology. Renal physiology* **2005**, *289*, F489-95.
- 127.Parsons, C.L. A model for the function of glycosaminoglycans in the urinary tract. *World journal of urology* **1994**, *12*.
- 128.Erickson, D.R. Interstitial Cystitis: Update on Etiologies and Therapeutic Options. *Journal of women’s health and gender-based medicine* **1999**, *6*, 745-758.

129. Parsons, C.L.; Shaw, T.; Berecz, Z.; Su, Y.; Zupkas, P.; Argade, S. Role of urinary cations in the aetiology of bladder symptoms and interstitial cystitis. *British journal of urology international* **2014**, *114*, 286–293.

## 13 Lebenslauf

### **Persönliche Angaben:**

Name: Mona Mozafari Torshizi

Geburtsdatum: 31.03.1981

Geburtsort: Teheran / Iran

Familienstand: Ledig

### **Beruflicher Werdegang:**

05/2017 bis heute Gastwissenschaftler an der TU Braunschweig  
PELAPO, Peiner Land-Apotheken

03/2017 Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik

11/2013 bis 04/2017 Wissenschaftliche Mitarbeiterin für Forschung und  
Lehre, Institut für Medizinische und Pharmazeutische  
Chemie der TU Braunschweig

07/2012 bis 09/2013 Apothekerin in Scharfenberg Apotheke, Northeim

11/2009 bis 05/2012 Apothekerin in Gauss Apotheke, Göttingen

06/2009 Approbation als Apothekerin

11/2008 bis 04/2009 Pharmazeutin im Praktikum in der Gorki-Apotheke  
Dr. Knoll, Berlin

05/2008 bis 10/2008 Pharmazeutin im Praktikum bei Bayer-Schering-  
Pharma, Berlin

---

**Hochschulstudium:**

09/2002 bis 09/2003	Staatliches Studienkolleg Nordhausen
10/2003 bis 03/2008	Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig

**Schulausbildung:**

1999	Abitur und Aufnahmeprüfung der Universitäten in Teheran
1995 bis 1999	Gymnasium Sama in Teheran
1992 bis 1995	Orientierungsschule Aeen Roshan in Teheran
1987 bis 1992	Grundschule Refah in Teheran